

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

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GÉNIE DES PROCÉDES

Spécialité : Eau et Environnement et Développement Durable

Production et caractérisation d'un
bioémulsifiant synthétisé par une souche
marine hydrocarbonoclaste Sdk644 à partir
des substrats solubles

-Présenté par :

M^{me} MAGBI Djaouida

et

M^{elle} AMIRI Soumya

-Encadré par :

M. BADIS Abdelmalek

- Co-encadreur :

M. ZENATI Billal, CNRDPA

Année universitaire 2016/2017

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

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

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

A mes frères Abdelhak ,Mohamed ,Mounir et ma sœur Anfel et son mari Hamza et ma petite ange marya qui étaient toujours à mes côtés et qui n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager: Jamais de simples mots ne me permettront de vous exprimer mes remerciements.

A ma grande famille, grande et petite.

A ma chère copine et mon binôme Djaouida.

Sans oublier tous mes ami(e)s de la promotion

A tous les famille AMIRI, ALOUCHE , BESBACI,MAGBI et BELJOUHEUR

*Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, est bien sur sans oublier notre co-encadreur **Mr ZENATI.***

Je vous dis Merci.

AMIRI Soumya

Dédicace

Je dédie ce modeste travail avant tout a mes chers parents, qui ont tout sacrifié pour mon bien, qui ont éclairé ma route pour leur compréhension et leur soutien.

Aussi a mes frères Mohamed et sa femme Djahida, El khiter et sa femme Saâdia et Omar et sa femme Hassina.

A mes sœurs Aicha, Massouâda et son mari Naime, Kheira et son mari Kaddour, Samia et son mari Abdennour sans oublier mes chers Neveux et Nièces .

A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de ce projet : mon Mari Nasserdine, et bien sur mon beau frère Rafik et sa femme Souad, mes belle sœurs Latifa et Siham et son mari Youcef et mes Beaux parents.

A mon binôme soumya sans oublier toutes mes amies.

A toutes les familles AMIRI, MAGBI et OULLAI, Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce projet soit possible, est bien sur sans oublier notre co-encadreur
Mr ZENATI.

Je vous dis Merci.

MAGBI Djaouida

Résumé

L'objectif de ce présent travail est la production et la caractérisation d'un bioémulsifiant produit par une souche bactérienne hydrocarbocarbonoclaste « *Marinobacterhydrocarbonoclasticus* Sdk644 ».

Les résultats concernant les meilleures conditions de production sont : le glycérol (2 %, v/v) comme source carbone, le nitrate de sodium comme source d'azote et un rapport C/N de 6,3, le chlorure de sodium a été montré comme élément précurseur de la production. Un bon rendement avec un milieu riche LB comparativement avec un milieu pauvre MSM (13,55 g/l et 1,52 g/l, respectivement). La production maximale a été obtenue à un temps plus réduit dans le milieu LB (16 h) par rapport au milieu MSM (40 h).

Par la suite, l'extraction du bioémulsifiant avec le mélange Chloroforme : Méthanol a donné un meilleur rendement (4,74 g/l) et une bonne émulsification (E24 de 60%). Le bioémulsifiant produit dans le milieu LB a montré une bonne stabilité thermique et acido-basique. Le bioémulsifiant produit dans les deux milieux avec le glycérol conduit à la formation d'émulsion stable vis-à-vis des substrats hydrophobes diversifiés, avec une amplitude différente.

L'analyse biochimique a révélé que le bioémulsifiant contient un taux de lipide de $28,99 \pm 6,23$ (%) et de glucides de $30,93 \pm 1,75$ (%) (mg équivalent de glucose/l). La caractérisation structurale par l'analyse IRRTA révèle que le bioémulsifiant produit dans les deux milieux LB et MSM ayant une structure similaire. Les groupements fonctionnels majeurs analysés sont assignés aux sucres et aux acides gras.

Mots clés : *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bioémulsifiant, production, stabilité, caractérisation.

Abstract:

The aim of this work is to study the production and the characterization of a bioemulsifier produced by a marine hydrocarbonoclastic bacteria, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus Sdk644* strain. Firstly, the main factors which affect the bioemulsifier production have been chosen. It was found that glycerol (2%, v/v) is the best carbon source, sodium nitrate as a nitrogen source and a C/N ratio of 6.3. Sodium chloride appeared as an important parameter in bioemulsifier production. In addition, the maximum yield production was observed in a rich medium LB instead of poor medium MSM (a concentration of 13.55 g/l in LB compared to 1.52 g/l in MSM). Maximum production was obtained in a short time with LB medium (16 h) than with MSM medium (40 h). Bioemulsifier extraction carried out with Chloroform/Methanol gave a high yield (4.74 g/l) and good emulsification (E24 of 60%). The bioemulsifier produced in LB medium showed a good thermal and acido-basic stability. The bioemulsifier produced in both media with glycerol as carbon source, drives to the formation of emulsions with variable extents against a variety of hydrophobic substrates. Biochemical analysis revealed that the bioemulsifier is composed of $28,99 \pm 6,23$ (%) lipid content and carbohydrates concentration of $30,93 \pm 1,75$ (%) Structural characterization by IRATR revealed that the bioemulsifier produced in LB and MSM media could have a similar structure. The major functional groups analyzed were assigned to sugars and fatty acids.

Key words: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bioemulsifier, production, stability, characterization.

ملخص:

الهدف من هذا العمل هو دراسة انتاج وتوصيف مستحلب حيوي تنتجه سلالة بكتيرية بحرية، «*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Sdk644».

أولا تم اختيار العوامل الأساسية التي تؤثر على انتاج المستحلب الحيوي وقد وجد أن الغليسرول (2% حجم/ حجم) هو أفضل مصدر للكربون، نترات الصوديوم كمصدر للأزوت ونسبة الكربون على الأزوت (C/N) تقدر ب6.3. كما ظهر أن كلوريد الصوديوم كعنصر مهم في إنتاج المركب الحيوي. بالإضافة إلى ذلك، لوحظ إنتاج أقصى في وسط غني LB بدلا من وسط فقير (MSM) (13.55 غ/ل في LB مقارنة ب1.5 غ/ل في MSM). تم الحصول على الحد الأقصى من الإنتاج في وقت قصير معالوسط LB (16 ساعة) مقارنة مع الوسط MSM (40 ساعة).

أعطى استخراج المستحلب الحيوي مع الخليط كلوروفورم:ميثانول افضل مردود (4,74 غ/ل) و استحلاب جيد (E24) يساوي 60%).

أظهرت المستحلبات الحيوية المنتجة في الوسطين مع الغليسرول تشكيل مستحلب مستقر مع ركائز نافرة للماء.

كشف التحليل الكيميائي ان المستحلب الحيوي يحتوي على معدل دهون بنسبة $28,99 \pm 6,23\%$. وتركيز للكربوهيدرات يقدر ب $1.75 \pm 30,93$ ملغ/ل.

كشف الوصف الهيكلي بتحليل الأشعة تحت الحمراء بانعكاس كلي مخفض، أن المستحلب الحيوي ينتج في الوسطين مع وجود بنية مماثلة تحتوي على السكريات والأحماض الدهنية كوظائف كيميائية أساسية.

الكلمات المفتاحية:

Marinobacter hydrocarbonoclasticus, المستحلب الحيوي, الانتاج, الاستقرار, الوصف.

REMERCIEMENT

Tout d'abord nous remercions Allah (Dieu) de nous avoir donné les efforts pour arriver à ce stade du succès et de nous orienter vers la lumière de la science et du savoir.

Nous remercions spécialement notre Promoteur **M.BADIS A**, Professeur à l'Université de Blida1, pour sa gentillesse, son aide, ses conseils précieux et sa patience qui ont donné vie à ce travail. Nous sommes très reconnaissants de tout ce qu'il nous a apporté tant du point de vue scientifique que du point de vue personnel.

Avec beaucoup de respect, nous remercions notre Co-promoteur **M.ZENATI B**, attaché de recherche au Centre National de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (**CNRDPA**), pour la qualité de son encadrement, sa confiance, et ses conseils qui ont été pour nous une aide inestimable ; merci profondément pour le temps consacré.

Nous remercions, vivement et profondément les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce travail.

Nous tenons à remercier vivement **Dr.Eddouaouda K**, pour sa contribution dans l'amélioration de la qualité du document.

Nous remercions également Mme **Kord A**, attaché de recherche au CNRDPA pour son soutien technique et moral, elle était toujours près de nous. Melle **Mesbaiah F/Z** maître de recherche au CNRDPA, quelle trouve ici le témoignage de nos vives salutations.

Nous tenons à exprimer nos remerciements au personnel de CNRDPA d'avoir accepté de nous accueillir, spécialement **Mr.Annane R. le directeur**, le staff des ateliers physico-chimiques : Mme **Djida F/Z**, **Mme Bounakous N.**, **Mme Benchama Y.** et **Mr.Hazem S/D** ainsi que les membres de l'atelier microbiologique, **Mme Chegrani A.**, **Mme Rebhi A.**, et **Melle.Hedemi A**. Nous remercions également **Mme Djellal K**.

Nous remercions vivement **Mme Yezli N** du Centre de Recherche en analyses physico-chimiques (**CRAPC**) de nous avoir passé des échantillons de Bioémulsifiant en analyse IRRTA.

Nous remercions également l'ingénieur du laboratoire biochimique et microbiologique dans notre département de génie des procédés **Mme Lounaoussi N.**, ainsi que **Mr Rachid** pour son soutien technique.

Un remerciement spécial au **Dr.Boutoumi H.** pour l'aide qu'il nous a apportée tant sur le plan moral que technique, Ainsi qu'au **MrLeutrache H.**, la doctorante Asma et **Prof.Khodja** de nous avoir donné accès à son laboratoire pour effectuer les manipulations d'hydrolyse des lipides et sucres.

Nous souhaitons également à remercier **Prof.El Hattab M.** et son équipe du laboratoire de recherche LCSN-BioM, surtout **MmeLyrrate**, de nous avoir autorisé à réaliser des mesures de la tension de surface et d'utiliser le rotavap.

Nous remercions notre chef de département **Dr.Cheknane O.** Un remerciement spécial à notre enseignant **Prof.Bouras O.** pour son soutien moral ainsi que tous les enseignants de notre département de chimie industrielle. Nous remercions tous et toutes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 :SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
1.1.INTRODUCTION	3
1.2.GENERALITES SUR LES BIOSURFACTANTS	3
1.2.1 Classification des biosurfactants	4
1.2.1.1 Selon leur composition chimique	4
1.2.1.2 Selon leur poids moléculaire	5
1.3.BIOEMULSIFIANTS	5
1.3.1 Définition	5
1.3.2 Classification	6
1.3.2.1 Émulsifiants glycolipidiques	6
1.3.2.2 Complexes lipides-polysaccharides	6
1.3.2.3 Bioémulsifiants lipides-acides aminés	7
1.3.2.4 Substances assimilées à des protéines	8
1.4.MICROORGANISMES MARINS PRODUCTEURS DE BIOEMULSIFIANTS	9
1.4.1 Microorganismes marins producteurs de bioémulsifiants	10
1.4.2 Microorganisme marine hydrocarbonoclastes	11
1.5. METHODES DE DETECTION DES BIOEMULSIFIANTS	12
1.5.1 Techniques de mesure de la production des bioémulsifiants	12
1.5.2 Techniques de séparation	13
1.5.2.1 Extractions par solvants	13
1.5.2.2 Précipitation par l'acétone et l'éthanol	13
1.5.2.3 Précipitation à l'aide du sulfate d'ammonium	13
1.5.3 Techniques de purification	14
1.5.3.1 Lyophilisation	14
1.5.3.2 Dialyse	14
1.5.3.3 Chromatographie à perméation de gel (CPG)	14
1.6.PARAMETRES INFLUENÇANT LA PRODUCTION DES BIOEMULSIFIANTS	15
1.6.1. Source de carbone	15
1.6.2. Source d'azote	15
1.6.3. pH	15
1.6.4. Sels minéraux	16
1.6.5. Ions métalliques	16
1.6.6. Effet de l'agitation	16
1.7.PROPRIETES DES BIOEMULSIFIANTS	16
1.7.1 Possibilité de réduire la tension superficielle et interfaciale	16
1.7.2 Capacité émulsifiante	17
1.7.3 Stabilité aux conditions extrêmes de pH, de température et de salinité	17
1.7.4 Toxicité	18
1.7.5 Capacité de moussage	18
1.8.APPLICATION DES BIOEMULSIFIANTS	18

CHAPITRE 2 :MATERIELS ET METHODES

2.1 MATERIEL BIOLOGIQUE	20
2.2 REPIQUAGE ET CONSERVATION DE LA SOUCHE.....	20
2.3 PRODUCTION DU BIOEMULSIFIANT	21
2.3.1 Préparation de la préculture.....	21
2.3.2 Milieux de production	21
2.3.2.1 Milieu des sels minéraux (MSM)	21
2.3.2.2 Milieu riche (LB)	22
2.3.3 Facteurs influençant la production du bioémulsifiant	22
2.3.3.1 Source de carbone	22
2.3.3.2 Source de d'azote.....	23
2.3.3.3 Rapport C/N.....	23
2.3.3.4 Effet de la salinité	23
2.3.3.5 Effet de la nature du milieu.....	23
2.3.3.6 Cinétique de production.....	23
2.4 EVALUATION DE LA PRODUCTION DU BIOEMULSIFIANT.....	24
2.4.1 Indice d'émulsification (E24)	24
2.4.2 Test de déplacement de pétrole (DDP).....	25
2.4.3 Tension de surface (TS).....	25
2.5 EXTRACTION DU BIOEMULSIFIANT.....	26
2.5.1 Élimination de la biomasse	26
2.5.2 Méthodes d'extraction	26
2.5.2.1 Précipitation par l'éthanol.....	26
2.5.2.2 Extraction par solvants.....	27
2.6 PROPRIETES DU BIOEMULSIFIANT.....	28
2.6.1 Propriété fonctionnelle.....	28
2.6.1.1 Stabilité du bioémulsifiant.....	28
2.6.1.2 Pouvoir émulsifiant.....	29
2.6.2 Propriétés structurales.....	30
2.6.2.1 Composition biochimique.....	30
2.6.2.2 Chromatographie sur couche mince	32
2.6.2.3 Analyse par infrarouge.....	35

CHAPITRE 3 :RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 PRODUCTION DU BIOEMULSIFIANT	36
3.1.1 Influence des principaux facteurs sur la production du bioémulsifiant	36
3.1.1.1 Influence de la source de carbone	36
3.1.1.2 Influence de la source d'azote.....	38
3.1.1.3 Influence du rapport C/N	39
3.1.1.4 Effet de la salinité	42
3.1.2 Influence de la nature du milieu.....	43
3.1.3 Cinétique de production	44

3.2 EXTRACTION DU BIOEMULSIFIANT	46
3.3 CARACTERISATION DU BIOEMULSIFIANT	47
3.3.1 Propriétés fonctionnelle du bioémulsifiant	47
3.3.1.1 Stabilité du bioémulsifiant	47
3.3.1.2 Pouvoir émulsifiant	52
3.3.2 Propriétés structurales	54
3.3.2.1 Dosage biochimique.....	54
3.3.2.2 Chromatographie sur couche mince (CCM)	55
3.3.2.3 Analyse par infrarouge (IRRTA)	57
CONCLUSION GENERALE	61

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CONCLUSION GENERALE

La souche marine « *Marinobacterhydrocarbonoclasticus* Sdk644 » isolée localement à partir d'un sédiment portier est une bactérie hydrocarbonoclaste et douée d'une activité productrice d'une biomolécule à fort potentiel biotechnologique ; il s'agit d'un biosurfactant d'un caractère émulsifiant.

L'ensemble des résultats obtenus montrent que :

- Les meilleures sources de carbone et d'azote sont respectivement, le glycérol (2 %, v/v) et le nitrate de sodium avec un rapport C/N de 6,3.
- Le chlorure de sodium est qualifié comme élément précurseur de la production.
- Un bon rendement de production avec un milieu riche LB comparativement avec le milieu pauvre MSM (13,55 g/l et 1,52 g/l, respectivement).
- La production maximale a été obtenue à un temps plus réduit dans le milieu LB (16 h) par rapport au milieu MSM (40 h).
- Un meilleur rendement d'extraction de bioémulsifiant est obtenu avec le mélange Chloroforme : Méthanol (4,74 g/l).
- Une bonne émulsification a été enregistrée en utilisant MSM glycérol (E24 de 60%). Sachant que le bioémulsifiant produit dans les deux milieux en présence du glycérol conduit à la formation d'émulsion stable des substrats hydrophobes diversifiés avec une amplitude différente.
- Le bioémulsifiant produit dans le milieu LB a montré une bonne stabilité thermique et acido-basique.
- L'analyse biochimique a révélé que le bioémulsifiant contient un taux de lipide de $28,99 \pm 6,23$ (%) et de glucides de $30,93 \pm 1,75$ (mg équivalent de glucose/l).
- La caractérisation structurale par l'analyse IRRTA révèle que le bioémulsifiant produit dans les deux milieux LB et MSM ayant une structure similaire. Les groupements fonctionnels majeurs analysés sont assignés aux sucres et aux acides gras.

Comme perspectives pour la poursuite de ce travail de recherche, nous pouvons envisager faire une étude structurale plus détaillée de notre bioémulsifiant, on fait appel aux moyens d'analyses les plus performants tels que Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN ^{13}C) et la spectroscopie de masse. En outre, le produit obtenu méritera une investigation à grande échelle afin de le commercialiser comme additif dans les différentes applications industrielles, à savoir, comme produit nettoyant des cuves contenant des hydrocarbures, dans la récupération assistée du pétrole ou en tant que émulsifiant en agroalimentaire.

LISTE DES ABREVIATIONS

LB : Luria Bertani.

MSM : Milieu des sels minéraux.

E24 : Indice d'émulsification.

DDP : Test de déplacement de pétrole.

DO : Densité optique.

TS : Tension de surface (mN/m).

m/m : Rapport masse sur masse.

m/v : Rapport masse sur volume.

v/v : Rapport volume sur volume.

HF : Huile de friture.

E/H : Emulsion eau dans l'huile.

H/E : Emulsion huile dans l'eau.

EF : Ethanol à froid.

Rf : Rapport frontal.

CG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectroscopie de masse.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

IRRTA : Infrarouge à réflexion totale atténuée.

CPG : Chromatographie à perméation de gel.

LISTE DES FIGURES

Figure1.1: Structure d'un tensioactif	3
Figure1.2 : Structures de quelques bioémulsifiants glycolipidiques	6
Figure1.3 : Structure de l'émulsane produit par <i>Acinetobactercalcoaceticus</i>	6
Figure1.4 : Structure primaire de la surfactine	7
Figure1.5 : Structure générale de la lichenysine.....	8
Figure2.1 : Mesure de l'indice d'émulsification.....	24
Figure2.2 : Prise de deux photos descriptifs du teste de déplacement de pétrole.....	25
Figure2.3 : Dispositif à reflux pour l'hydrolyse des carbohydrates	31
Figure2.4 : Schéma explicatif du rapport frontal.....	32
Figure2.5 : Schéma d'une chambre de CCM avec ses différents composants	33
Figure3.1 : Influence de la source de carbone sur la croissance bactérienne, l'activité de surface et l'activité émulsifiante dans le milieu de production MSM	36
Figure3.2 : Influence de la source d'azote sur la croissance bactérienne, l'activité de surface et l'activité émulsifiante dans le milieu de production MSM	38
Figure3.3 : Influence du rapport C/N sur la croissance bactérienne et l'activité émulsifiante dans le milieu de production MSM.....	40
Figure3.4 : Influence du sel sur la croissance bactérienne, et l'activité émulsifiante dans le milieu de production MSM.....	42
Figure 3.5 : Influence de la nature du milieu (riche ou minimum) sur l'activité de surface et l'activité émulsifiante.....	43
Figure 3.6 : Cinétique de croissance et de production de bioémulsifiant.....	45
Figure 3.7 : Prise photo montre l'effet de la température sur l'activité émulsifiante dans le milieu MSM-glycérol	47
Figure 3.8 : prise photo montre l'effet de la température sur l'activité émulsifiante dans le milieu LB-glycérol.....	48
Figure 3.9 : la stabilité thermique de bioémulsifiant avec trois températures différentes dans le milieu MSM+glycérol et LB +glycérol.....	48
Figure3.10 : Stabilité de bioémulsifiant(surnageant MSM-glycérol) à différents pH.....	49
Figure 3.11: Stabilité de bioémulsifiant(surnageant LB-glycérol) à différents pH.....	50
Figure 3.12: la stabilité émulsifiante de BioE644 produit par le milieu LB en fonction du temps.....	51
Figure 3.13 : Courbe d'étalonnage des glucides.....	54
Figure 3.14 : Révélation des sucres avec (a) la solution de glucose et (b) avec le bioémulsifiant	55
Figure 3.15 : Révélation des sucres avec les solutions de glucose et de bioémulsifiant ...	56
Figure 3.16 : Révélation des acides aminés en milieu liquide.....	56
Figure 3.17 : Révélation des lipides avec une solution aqueuse de bioémulsifiant.....	56
Figure 3.18 : Analyse par infrarouge du bioémulsifiant.....	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Propriétés physico-chimiques et physiologiques des bioémulsifiants.....	19
Tableau 3.1 : Effet de la source de carbone sur les cinétiques de croissance et de production du bioémulsifiant.....	37
Tableau 3.2 : Effet de la source d'azote sur les cinétiques de croissance et de production de bioémulsifiant.....	39
Tableau 3.3 : Effet du rapport C/N sur les cinétiques de croissance et de production du bioémulsifiant	40
Tableau 3.4 : Test de reproductibilité des résultats des essais réalisés sur « l'influence du rapport C/N »	41
Tableau 3.6 :Efficacité des différents solvants utilisés pour l'extraction de Bioémulsifiant	46
Tableau 3.7 . Pouvoir émulsifiant du bioémulsifiant.....	52

1.1. INTRODUCTION

Les surfactants (ou agents de surface actifs) sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire (soluble dans l'eau) et d'une partie hydrophobe non polaire (soluble dans l'huile) (figure 1.1). 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 [13,14]. Les surfactants peuvent répondre à un grand éventail d'applications industrielle et environnementale.

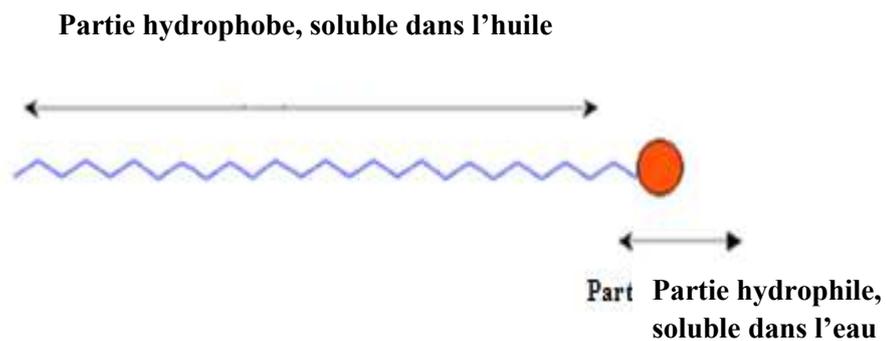


Figure 1.1 : Structure d'un tensioactif.

1.2. GÉNÉRALITÉ SUR LES BIOSURFACTANTS

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés [15].

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de surfactants chimiques [3,13]:

- Les cationiques qui possèdent une charge positive .

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

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du surfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification [13]

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. La revue bibliographique révèle que la majorité des biosurfactants produits sont de type anionique ou non ionique [16,7]. Il existe peu de structures cationiques [17].

Cependant et dans certains cas, la présence de groupements contenant des atomes d'azote confère un certain caractère cationique à la molécule, ce qui va influencer ses propriétés d'adsorption ou de floculation par exemple.

1.2.1 classification des biosurfactants

1.2.1.1 Selon leur composition chimique

On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres [18].

- Les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques [4,19]. Un exemple des glycolipides les étudiées sont ceux des rhamnolipides produits par *Pseudomonas* spp.
- Les lipopeptides sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptidique. La surfactine produite par *Bacillus* spp. est l'une des exemples types.
- Les phospholipides sont formés de groupements alcools et phosphate et de chaîne lipidique. Healy *et al.*, (1996) [4] indique que bien qu'ils sont présents dans tous les micro-organismes, il y a peu d'exemples de production extracellulaire,

- Les lipopolysaccharides ou polymériques sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras. Ce sont les biosurfactants qui possèdent la masse molaire la plus élevée,
- Les acides gras et lipides neutres.

1.2.1.2 Selon leurs poids moléculaires

Les biosurfactants sont divisés en grandes deux classes :

➤ Composés à faible poids moléculaire

Ils comprennent les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides [20]. Ces molécules communément appelés biosurfactants réduisent efficacement les tensions de surface et interfaciales [21].

➤ Polymères à haute poids moléculaire

On trouve dans cette classe les polysaccharides amphiphiles, les protéines lipopolysaccharides ou les lipoprotéines [21]. Ces polymères ou bioémulsifiants sont plus efficaces dans la formation des émulsions stables de type huile dans l'eau, sans diminuer efficacement la tension de surface [21].

1.3. BIOÉMULSIFIANTS

1.3.1 Définition

Les bioémulsifiants sont des agents tensio-actifs de haut poids moléculaire produits par certaines espèces de microorganismes. Ils conduisent à la formation d'émulsions stables, sans provoquent une réduction importantes des tensions interfaciales et de surface. Le rôle naturel des bioémulsifiants est la formation de biofilms, l'augmentation de la biodisponibilité des substrats insolubles dans l'eau, la régulation de l'attachement-détachement du microorganisme vers et à partir de la surface de la cellule. Les bioémulsifiants ont également une activité antimicrobienne [22].

1.3.2 Classification

Les bioémulsifiants les plus étudiés, essentiellement d'origine microbienne. Ils ont été répartis en quatre classes selon leur nature chimique[23].

1.3.2.1 Émulsifiants glycolipidiques

Des espèces telles que *Torulopsis*, *Pseudomonas* ou *Arthrobacter* ont la capacité de synthétiser des sophorose-, rhamnose-, tréhalose- (Figure 1.2), saccharose- et fructose-lipides, les espèces *Candida* et *Shizonella* des lipides mannosylérythritol et *Usilagozeae* des lipides cellobiose[9].

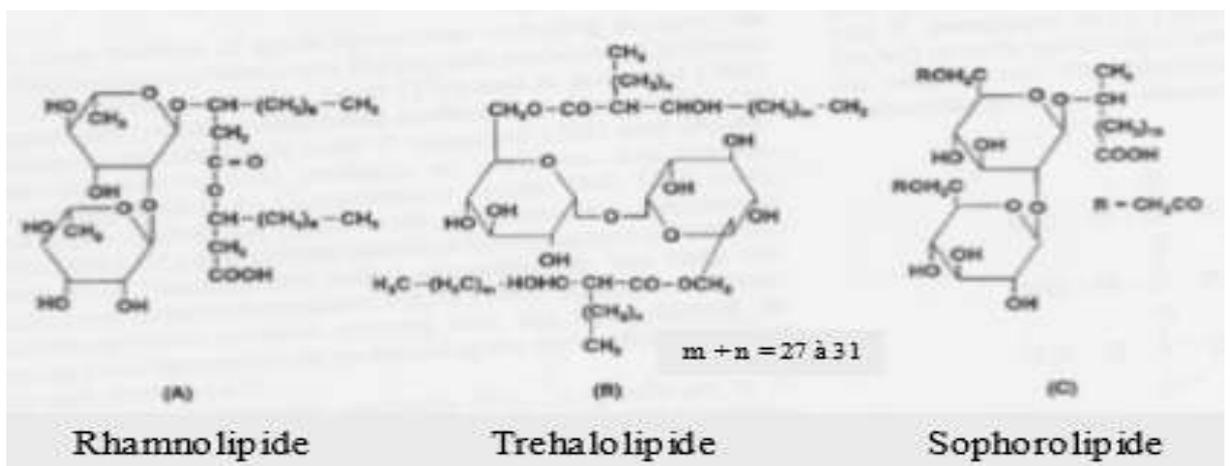


Figure 1.2: Structures de quelques bioémulsifiants glycolipidiques. (A) rhamnolipide de type I produit par *Pseudomonasaeruginosa*. (B) trehalosedimycolate par *Rhodococcuserythropolis*. (C) sophorolipide par *Torulopsisbombicola* [9].

1.3.2.2 Complexes lipides-polysaccharides

Un exemple représentatif de ce groupe est l'émulsane, produit par *Acinetobactercalcoaceticus*. C'est un lipopolysaccharidepolyanionique extracellulaire (Figure 1.3).

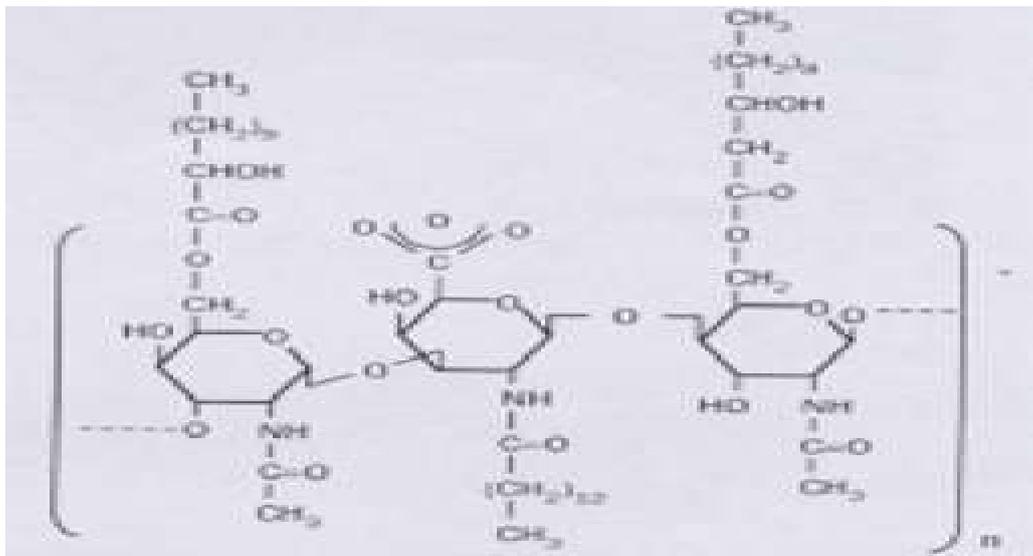


Figure 1.3 : Structure de l'émulsane produit par *Acinetobacter calcoaceticus*, lié à un acide gras [15].

1.3.2.3 Bioémulsifiants lipides-acides aminés

La surfactine, produite par *Bacillus subtilis*, est à ce jour l'un des bioémulsifiants les plus efficaces. Elle est composée d'un anneau de sept résidus d'acides aminés (Glu-Leu-LeuVal-Asp-Leu-Leu) couplé à une molécule de 3-hydroxy-13-acide méthyltétradécanoïque (Figure 1. 4). Elle a une importante activité de surface et des propriétés biologiques (activités antivirale, antibactérienne, hémolytique), qui proviennent de sa capacité à interagir avec des biomembranes [24,25].

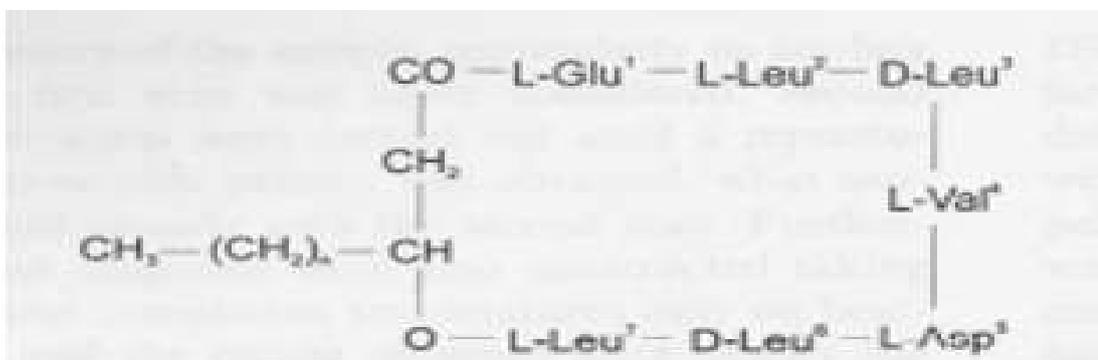


Figure 1.4 : Structure primaire de la surfactine [27].

La densité et la stabilité des mousses formées en présence de surfactine dépendent des caractéristiques d'hydrophobie de la chaîne alkyl et des propriétés moléculaires intrinsèques à la protéine. Ainsi les mousses les plus stables et la meilleure capacité à former des mousses ont été obtenus avec des chaînes de quatorze atomes de carbone [26]. Lorsque les acides aminés sont modifiés par de l'acide sulfonique aminométhane, l'activité de surface de la surfactine est très affaiblie, certainement du fait de répulsions de charges et de distorsions structurales inhibant la formation de micelles. L'activité est meilleure à pH alcalin qu'acide.

D'autres lipopeptides ont été mis en évidence, tels que la subtiline produite par *Bacillus subtilis*[27] ou la lichenysine A. La lichenysine A produite par *Bacillus licheniformis* est un lipopeptide cyclique dont la structure est donnée dans la Figure 1.5. Sa séquence peptidique est proche de la surfactine, mais son pouvoir surfactant est supérieur et il est un très bon agent chélatant des cations. Il possède en outre une CMC très basse [28].

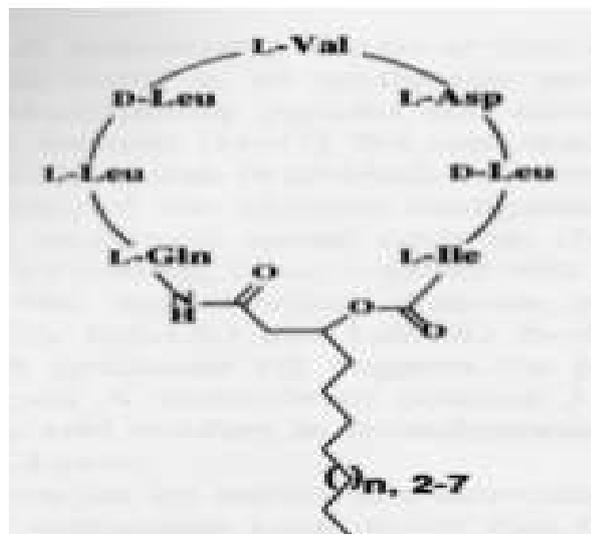


Figure 1.5 : Structure générale de la lichenysine A [29].

1.3.2.4 Substances assimilées à des protéines

Cirigliano et Carman (1984) [30], ont mis en évidence la synthèse d'un émulsifiant par la levure *Yarrowialipolytica* uniquement lorsqu'elle est cultivée sur des substrats carbonés non miscibles à l'eau. Le liposan produit possède un pouvoir émulsifiant pour des pH

acides ou neutres. Il est stable entre 30 et 90 °C et son activité n'est pas dépendante d'ions métalliques. Il est soluble dans l'eau. Après purification, il peut servir à stabiliser un grand nombre d'émulsions huile dans eau. En 1985, Cirigliano et Carman ont déterminé que le liposan était constitué à 83 % de sucres (hétéropolysaccharide de glucose, galactose, galactosamine et acide galacturonique) et à 17 % de protéines. Si son pouvoir émulsifiant et stabilisateur est inférieur aux Triton (80, 20 et X-100), il a un meilleur pouvoir émulsifiant que les caséines, les alginates, le dextran et il est meilleur stabilisateur que les caséines, les pectines et le dextran.

L'alasane produite par *Acinetobacter radioresistens* KA53 est constituée d'un polysaccharide et de trois protéines. Sa composante protéique fait 35,77 kDa et comporte quatre régions hydrophobes. Ces quatre régions constituent des sites de liaisons hydrophobes qui permettent à la protéine d'avoir une conformation correcte à la surface des gouttelettes lipidiques et préviennent ainsi la coalescence [31].

Un bioémulsifiant est produit par une souche de *Bacillus* lorsqu'elle est cultivée en présence de pesticides organophosphorés. Il permet l'émulsion des substrats non miscibles. Ce glycopeptide a une haute masse moléculaire, il est thermostable. Un tel bioémulsifiant pourrait avoir des applications dans la formulation de pesticides ou dans leur retraitement.

Cameron *et al.*, (1988) [22] ont montré qu'une mannoprotéine, composante majoritaire de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae*, était un bioémulsifiant efficace : les émulsions stabilisées sont résistantes au cours de cycles de congélation / décongélation. Torabizadehet *al.* (1996)[32] ont purifié ce bioémulsifiant : sa masse moléculaire est de 14 à 15,8 kDa et à partir de 1 kg de cellules de *Saccharomyces cerevisiae*, 100 g de mannoprotéine peuvent être récupérés.

1.4. MICROORGANISMES PRODUCTEURS DES BIOÉMULSIFIANTS

Les microorganismes sont capables de synthétiser une large gamme de différents bioémulsifiants. Des exemples de ceux-ci comprennent les lipopolysaccharides, les lipoprotéines, les protéines, les acides lipoteichoïques, les lipoglycans, les lipomananes, les lipoprotéines, les glycoprotéines ou les mélanges complexes de ces biopolymères.

Ces polymères microbiens sont connus pour contenir des sucres désoxy (6-désoxy-rhamnose ou fucose), des constituants hydrophobes comme les groupes acyle, méthyl ou d'autres groupes, et parfois même des acides gras. Il existe d'autres sucres désoxy recrutés par les microorganismes qui sont responsables du caractère hydrophobe.

Pour la synthèse et l'assemblage de ces molécules, les microbes utilisent la voie de-novo et / ou l'assemblage à partir de substrats. Les meilleurs bioémulsifiants étudiés et les premiers sont les bioémulsants produits par différentes espèces d'*Acinetobacter*[33, 34, 35].

1.4.1 Microorganismes marins producteurs de bioémulsifiants

Le milieu marin ou les zones côtières en général sont une source potentielle des microorganismes qui sont bien connus pour leurs propriétés bioactives variées, qui comprennent la production de métabolites secondaires, des enzymes hautement thermostables et des composés bioactifs. Un grand nombre de microorganismes producteurs de bioémulsifiants ont été isolés : *Acinetobacter radioresistens*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhodotorula glutinis*, *Antarctobacter* sp. , *Halomonas* sp., *Alcaligenes* sp., *Halomonas aurithalina*, *Pseudomonas putida*, *Planococcus matriensis*, etc. La souche *Planococcus matriensis* Anita marine produit de bioémulsifiant dont la composition chimique est : glucides (12,06%), protéines (24,44%), acide uronique (11%) et sulfate (3,03%). Il forme des émulsions stables avec le xylène et les huiles de paraffine et silicone. La valeur de la tension de surface était de 46.07 mN/m [36]. Amaral et al. (2006)[37] ont isolé une souche de levure, *Yarrowia lipolytica*. Le bioémulsifiant produit est de nature de glycolipopeptidique : 15% de protéines, 35%, d'acide palmitique, 21% d'acide stéarique, 9% d'acide laurique et 7% d'acide oléique (6,9%). Son poids moléculaire était d'environ 20 kDa avec une valeur de CMC de 0,5 g/L.

La plupart des études antérieures se sont appuyées sur les applications environnementales des biosurfactants (émulsifiants/dispersants). Récemment, la tendance a changé et les recherches ont commencé à se concentrer sur d'autres applications : antimicrobiens, la élimination du biofilm, la synthèse des nanoparticules, etc.

1.4.2 Microorganismes marins hydrocarbonoclastes

Une communauté bactérienne très diversifiée sera plus à même de faire face à une perturbation du milieu et reviendra plus rapidement à son état d'origine qu'une communauté moins diversifiée [38,39]. Cela prend tout son sens dans le cas d'une pollution pétrolière. En effet, parmi les bactéries marines, cela fait tout juste un siècle que des bactéries capables d'utiliser les hydrocarbures pétroliers comme seule source d'énergie et de carbone ont été isolées pour la première fois [40], ce sont les bactéries hydrocarbonoclastes (HCB pour hydrocarbonoclasticus bacteria).

La plupart des bactéries hydrocarbonoclastes appartiennent aux protéobactéries. On peut noter quelques genres majoritaires parmi les 79 récemment répertoriés [41] : *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Thalassolituus*, *Oleispira* et *Vibrio*. De nombreuses études ont montré qu'elles étaient ubiquistes et présentes en faible quantité même dans les environnements dépourvus de contamination [42,43].

Naturellement, leurs effectifs sont accrus dans les zones chroniquement polluées par les hydrocarbures et augmentent après un apport de pétrole [38,44]. Mais chacun de ces genres bactériens n'est capable de dégrader qu'un nombre restreint d'hydrocarbures alors que le pétrole est composé de centaines voire de milliers de molécules différentes. Par exemple il a été clairement établi que le genre *Alcanivorax* est prépondérant dans la dégradation des alcanes [45], alors que le genre *Cycloclasticus* est associé à la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) n'excédant pas trois cycles benzéniques [46]. La biodégradation totale d'un pétrole n'est donc possible que grâce à la mise en place d'un consortium bactérien comprenant des groupes dont les équipements enzymatiques complémentaires permettent la biodégradation quasi-totale de ces différents types d'hydrocarbures [47]. Si les bactéries dégradant les composés les plus simples (comme les alcanes linéaires à courte chaîne) sont abondantes dans l'environnement, celles qui possèdent les machineries enzymatiques pour dégrader les composés les plus complexes (comme par exemple les composés aromatiques de plus de quatre cycles) sont beaucoup moins répandues [48].

Le niveau de dégradation des pétroles (mélange de composés facilement dégradables et de composés récalcitrants) est donc totalement dépendant de la diversité métabolique des bactéries hydrocarbonoclastes présentes dans l'environnement pollué. La diversité des espèces bactériennes est un facteur décisif dans la réponse des communautés bactériennes à ce type de variation environnementale. Son étude est primordiale pour la compréhension du phénomène d'élimination naturelle des polluants pétroliers [caroline].

1.5.METHODES DE DETECTION DES BIOÉMULSIFIANTS

1.5.1 Techniques de mesure de la production de bioémulsifiants

La détection des tensioactifs biologiques est souvent basée sur la mesure de la tension superficielle. D'autres méthodes sont également utilisées : le déplacement de pétrole (DDP), l'activité hémolytique, l'utilisation de l'indice d'émulsification E24 (l'activité d'émulsification) et l'adhésion des bactéries aux hydrocarbures (BATH) également connu sous le nom d'hydrophobicité de la surface cellulaire [49,50].

Selon Satpute *et al*, (2008) [50] ces méthodes sont insuffisantes pour l'identification et la différenciation entre les bioémulsifiants et les biosurfactants. Ceci est dû au fait que les bioémulsifiants sont mieux connus pour l'émulsification sans réduction significative de la tension de surface. Expérimentalement, il a été démontré qu'il n'y a pas une corrélation entre la tension de surface et l'indice d'émulsification.

L'indice d'émulsification E24 et l'activité d'émulsification sont des tests nécessaires pour mesurer la capacité d'émulsification de toute molécule de surface active avec différents hydrocarbures. En utilisant l'indice d'émulsification E24, Viramontes-Ramos *et al* (2010)[51] ont identifié six isolats producteurs des émulsifiants montrant une efficacité permet d'émulsifier les différents hydrocarbures (plus de 50% contre le diesel, le décane, le kérosène et l'huile moteur) sans réduction significative de la tension de surface.

Le potentiel émulsifiant des composés tensioactifs issus de différentes levures ne présentant aucune réduction de la tension superficielle a été évalué à l'aide du test de l'indice d'émulsification [37,52]. Souza *et al*. (2012) [53] ont identifié un bioémulsifiant

puissant produit par *Yarrowia lipolytica* qui présentait des valeurs élevées d'émulsification avec les hydrocarbures, sans réduction de la tension superficielle.

1.5.2 Techniques de séparation

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

La récupération des biosurfactants/bioémulsifiants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques communément utilisées pour l'extraire sont [23] :

1.5.2.1 Extractions par solvants

Les solvants généralement utilisés sont le mélange de Chloroforme :méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc.

1.5.2.2 La précipitation à l'aide d'acétone et d'éthanol

La précipitation avec des solvants organiques, tels que l'éthanol ou l'acétone a été utilisé depuis plus de cent ans, mais la technique est probablement mieux connue pour son utilisation dans le fractionnement du sérum humain dans le travail classique de Cohen et Edsall. Ce soucier doit être amené à effectuer des précipitations à des températures très froides pour éviter dénaturation des protéines, en cas de bioémulsifiants de nature protéique [54].

1.5.2.3 La précipitation à l'aide de sulfate d'ammonium

Bien que plusieurs sels puissent être utilisés comme précipitant, le sulfate d'ammonium a plusieurs propriétés qui le rendent plus utile. Il est très stable à la structure des protéines, très soluble, relativement peu coûteux par rapport à la précipitation par l'éthanol. Le produit pur est facilement disponible, et la densité d'une solution saturée (4,1 mol/l) à 25°C ($\rho=1,235$ g/ml) n'est pas aussi élevée qu'un autre agent de salage comme le phosphate de potassium (3 mol/l, $\rho= 1,33$ g/ml).

Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices [54].

1.5.3 Techniques de purification

1.5.3.1 Lyophilisation

Tout d'abord, que veut dire lyophilisation ? Etymologiquement, le mot « lyophile », de racines grecques « lyo- » et « -phile », signifie textuellement « ami des solvants » ou « qui aime les solvants ». En effet, un produit lyophilisé se présente sous un aspect solide, friable et poreux, et se caractérise notamment par son avidité importante en eau. La lyophilisation, ensemble des manipulations qui conduisent à obtenir cet état (pouvant aussi s'appeler cryodessiccation, voire cryosublimation), est un procédé basé, à la fois sur :

- l'utilisation du froid : congélation brutale.
- la déshydratation : sublimation de la glace formée [55].

1.5.3.2 Dialyse

Au passé, la technique de dialyse a été utilisée dans des nombreuses études, afin de déterminer la liaison entre les surfactants et les protéines.

La dialyse est habituellement effectuée sur le produit brut pour éliminer les impuretés de bas poids moléculaire ainsi que les sels formés pendant la procédure d'extraction [56].

1.5.3.3 Chromatographie à perméation de gel (CPG)

La CPG est un type de chromatographie d'exclusion de taille qui pourrait être utilisé pour fractionner les bioémulsifiants. Malheureusement, cette technique est rarement utilisée pour ce groupe de composés probablement en raison des difficultés qui pourraient être rencontrées lors de l'analyse d'un polymère qui n'est ni protéine entier ni un glucide entier. La CPG est régulièrement utilisée pour déterminer le poids moléculaire moyen des protéines et des polysaccharides ; il serait difficile d'obtenir un poids moléculaire fiable pour les bioémulsifiants. Ceci est principalement dû au fait que la chromatographie d'exclusion de taille peut également afficher d'autres mécanismes chromatographiques tels que les effets d'échange d'ions. Pour cette raison, le pH et la force ionique du tampon de la phase mobile sont essentiels. Étant donné que les bioémulsifiants sont principalement composés d'une proportion significative de protéines et de glucides incorporés dans sa structure, le choix du tampon pour s'assurer que seuls les mécanismes d'échange de taille sont observés devient extrêmement difficile. De plus, lors de l'analyse de protéines et de

polysaccharides, les standards de protéines et de polysaccharides pullulanes peuvent être utilisés pour générer une courbe de poids moléculaire externe, qui est ensuite utilisée pour obtenir des inconnus. À ce jour, ces standards ne sont pas disponibles pour les bioémulsifiants ou même pour tout autre polymère mélange. Cependant, la CPGreste avantageuse pour purifier et fractionner de bioémulsifiants complexesdufait que la séparation en fonction de la taille moléculaire se produit toujours bien, mais sans pouvoir déterminer avec précision le poids moléculaire [57].

1.6.PARAMETRES INFLUENÇANT LA PRODUCTION DES BIOÉMULSIFIANTS

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

1.6.1 Source de carbone

Généralement, la source de carboneest divisée entrois catégoriesà savoir :les glucides, les hydrocarbures et les huiles végétales. En effet, letype, la qualitéet la quantitédebiosurfactantsontinfluencés par la naturedu substrat.Lescomposés solubles(glucose, saccharose et glycérol)peuvent être utilisés comme source de carbonepour la production debiosurfactants[58].

1.6.2 Source d'azote

La source d'azote est un paramètre important dans la régulation de la synthèse de biosurfactant. L'azote peut être apporté sous différentes formes (les sels d'ammonium, nitrates, l'urée, ...)selon les bactéries productrices [59, 15].L'optimisation du rapport C/Nest indispensable afin d'obtenir unbon rendement de production.

1.6.3 pH

Le métabolisme cellulaire est sensible au pH qui affecte les réactions chimiques des cellules vivantes.Généralement, les milieux fortement acides et fortement alcalinssont défavorables pour la production de bioémulsifiants.

1.6.4 Sels minéraux

Il semblerait qu'une concentration limitée en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production [60].

1.6.5 Ions métallique

Les ions métalliques jouent un rôle très important dans la production de certains biosurfactants car ils forment des cofacteurs importants de nombreuses enzymes. Dans un milieu à base de sels minéraux.

1.6.6 Effet de l'agitation

L'agitation est considérée comme paramètre important pour la croissance cellulaire. Elle influe sur l'efficacité du transfert de masse de l'oxygène et des composants du milieu. En augmentant le taux d'agitation de 100 à 250 tr/min, la production maximale de Rhamnolipides était à 200 tr/min et la biomasse microbienne a également été améliorée deux fois. Ce qui indique que l'élévation du niveau de DO semble avoir un effet positif sur la croissance cellulaire et la production de Rhamnolipide [61].

1.7. PROPRIETES DES BIOEMULSIFIANTS

1.7.1 Possibilité de réduire la tension superficielle et interfaciale

Les bioémulsifiants sont plus élevés en masse moléculaire que les biosurfactants car ils sont des mélanges complexes d'hétéropolysaccharides, lipopolysaccharides, lipoprotéines et protéines [62]. Ils sont également connus sous le nom de biopolymères ou d'exopolysaccharides à haut poids moléculaire. Comme pour les biosurfactants, ces molécules peuvent efficacement émulsionner deux liquides non miscibles tels que des hydrocarbures ou d'autres substrats hydrophobes, même à de faibles concentrations, mais en revanche sont moins efficaces à la réduction de la tension superficielle. Par conséquent, on peut dire qu'ils ne possèdent qu'une activité émulsionnante et non une activité de surface. Ils sont également impliqués dans la solubilisation de substrats peu solubles, augmentant ainsi leur accès et leur disponibilité pour la biodégradation. Cependant, dans un environnement pollué par l'huile, ces molécules jouent un rôle spécifique de liaison étroite avec les hydrocarbures dispersés et les huiles qui les empêchent de fusionner. Ce

processus est connu sous le nom de stabilisation de l'émulsion et a été attribué au nombre élevé de groupes réactifs exposés dans leurs structures.

1.7.2 Capacité émulsifiante

Les bioémulsifiants sont capables de stabiliser les émulsions en augmentant leur stabilité cinétique et cette propriété a augmenté leur utilité dans les industries des produits cosmétiques, alimentaires, pharmaceutiques et pétroliers. Les rapports ont montré que l'activité émulsionnante efficace des bioémulsifiants est fonction de leur composition chimique [52, 63,64], les biomolécules actives en surface sont classées en tensioactifs et émulsifiants, tandis que les tensioactifs jouent le rôle de réduction de la tension superficielle, les émulsifiants sont impliqués dans la formation et la stabilisation des émulsions. Cependant, certaines biomolécules possèdent à la fois des propriétés tensioactives et émulsionnantes qui contribuent à leurs fonctions uniques et à de larges utilisations industrielles.

1.7.3 Stabilitéaux conditions extrêmes de pH, de température et la salinité

Les biosurfactants/bioémulsifiants sont connus pour leur stabilité dans des conditions extrêmes de pH, salinité et température.

Le bioémulsifiant synthétisé par *Microbacterium* sp. MC3B-10 produit une émulsion très stable (94%) à 50 ° C, pH 10 et 3,5% (m/v) de NaCl [65]. Les exopolysaccharides sont bien connus par leur grande stabilité et activité émulsifiante à des valeurs de pH extrêmes.

En outre, les polysaccharides, à savoir PS 3a24 et PS 3a35 produits par des bactéries marines possèdent une viscosité spécifique élevée, une pseudoplasticité et une stabilité sur une large gamme de pH et en présence d'une variété de sels [66]. Un bioémulsifiant de polysaccharides produits par *Variovorax paradoxus* a conduit à la formation d'une émulsion huile/eau stable et consistante et a maintenu son activité émulsifiante jusqu'à 100 °C et à basses températures [21].

Ces propriétés intéressantes offrent les opportunités pour les bioémulsifiants à s'appliquer en environnements extrêmes pour la récupération microbienne assistée du pétrole et la biodégradation des boues de pétrole [67]. De plus, ils permettent leur utilisation dans les

procédés industriels d'agroalimentaire et pharmaceutique impliquant souvent une exposition à des températures extrêmes, pression, pH et force ionique

1.7.4 Toxicité

En raison de leur origine naturelle, les dérivés microbiens des émulsifiants sont reconnus comme des composés faibles ou non toxiques. Munstermann *et al* (1992)[68] ont montré une toxicité réduite de dérivés microbiens composés tensio-actifs (Trehalosedicorynomycolate et Trehalose tétraester de *R. erythropoli*) par rapport à différents tensioactifs synthétiques.

1.7.5 Capacité de moussage

Un agent moussant est un composé qui facilite la formation de mousse. Un tensioactif, lorsqu'il est présent en faibles quantités, réduit la tension de surface d'un liquide (réduit le travail nécessaire pour créer la mousse) ou augmente sa stabilité colloïdale, en inhibant la coalescence des bulles ce qui provoque la formation de la mousse. Des études ont suggéré qu'il existe une forte corrélation entre l'hydrophobicité de la surface cellulaire, la production de biosurfactant et la formation de mousse [69].

1.9. APPLICATIONS DES BIOÉMULSIFIANTS

Généralement, les bioémulsifiants ont été associés à un certain nombre d'applications potentielles, y compris: l'assainissement de l'eau polluée et du sol, la récupération améliorée du pétrole et le nettoyage des navires et des machines contaminés par l'huile; enlèvement de métaux lourds [52, 70, 71] formation d'émulsions stables dans les industries alimentaires et cosmétiques [72], et les activités thérapeutiques (agents antibactériens, antifongiques, pesticides et herbicides) [73]. Les propriétés physico-chimiques des bioémulsifiants sont présentées dans le tableau 1.1.

Tableau 1.1 : Propriétés physico-chimiques et physiologiques des bioémulsifiants [74].

Type	Microorganisme producteur	Propriétés physico-chimique	Rôle physiologique
Emulsan RAG-1	Acinetobactèresp.ATCC 31012	Lipopolysaccharides (acide gras insaturé)	- Augmentation de la biodisponibilité des substrats peu solubles -Fixation des métaux lourds toxiques
Emulsan BD4	Acinetobactèrecalcoaceticus BD4	Complexe de polysaccharies et protéines	Stabilisateur:émulsion huile dans l'eau
alasan	Acinetobacter radioresistens KA53	Alanine : polysaccharides et Proteines	Emulsification et solubilisation
Mannoproteins	Saccharomyces Cerevisiae	Polysaccharide etproteines	Formation des émulsions stables
Bioémulsifiant de type acide uronique	Halomonaseurihalina Klebsiellasp.	Polysaccharides- protéinss-acide uronique	Emulsification et détoxification des hydrocarbures

Les principaux objectifs de ce travail de mémoire sont la production et la caractérisation d'un bioémulsifiant produit par une souche marine hydrocarbonoclaste à partir des substrats solubles.

Les différents essais réalisés pour le compte de ce mémoire ont été effectués conjointement au niveau du laboratoire de microbiologie et de biochimie, dans le département de génie des procédés de l'université de Blida -1-, ainsi qu' au niveau de l'atelier physicochimique et l'atelier microbiologique dans le Centre National de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) à Bou-Ismaïl, Cependant, la grande partie des expériences a été réalisée au niveau du CNRDPA.

2.1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Le matériel biologique principal utilisé dans cette étude est représenté par la souche bactérienne marine Sdk644, une souche mésophile isolée antérieurement à partir d'un sédiment portuaire contaminé par les hydrocarbures. Cette souche a été sélectionnée après un criblage de dizaines de souches sur leur pouvoir à utiliser et à dégrader les hydrocarbures (pétrole, aliphatiques et polyaromatiques) et à produire de biosurfactants. Cette souche a été affiliée au genre et à l'espèce *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* par l'analyse phylogénétique de l'ARN 16 S (Données non publiées).

2.2. REPIQUAGE ET CONSERVATION DE LA SOUCHE

Pour maintenir la souche bactérienne dans les bonnes conditions et prévenir tout problème de contamination, un repiquage périodique est fait en boîtes et en tubes inclinés.

2.2.1 Repiquage en boîte

La souche est repiquée chaque quinze jours dans des boîtes de pétri contenant un milieu de culture solide Luria Bertani (LB) dont la composition et sa préparation est la suivante (g/l l'eau distillé) : 23 NaCl, 10 peptone et 5 extrait de levure. De l'agar est additionné au milieu (18 g/l) pour gélifier le milieu. Le pH du milieu est ajusté à 7 avec une solution de 1 mol/l de soude caustique (NaOH). L'agar étant pratiquement insoluble dans le milieu à température ambiante, le mélange est donc chauffé à une température plus de 50 °C pour que le milieu devienne homogène. Le milieu est ensuite réparti en flacons de 250 ml de capacité et autoclavé à 120 °C pendant 20 min. Nous attendons le refroidissement du milieu après autoclavage (une température de moins de 50 °C), nous faisons alors la

distribution du milieu dans les boîtes de pétri. Après gélification du milieu (plus de 30 min), une petite quantité de la souche Sdk644 (portée à l'aide d'une anse de pasteur ou bien l'anse de platine) est repiquée en stries dans les boîtes colées. Les semences bactériennes sont ensuite incubées à 30 °C pendant 48 h. Après développement des colonies, les boîtes sont conservées au froid (+ 4°C).

2.2.2 En tubes incliné

Nous faisons pratiquement les mêmes étapes précédentes. Le milieu LB gélosé (avec l'ajout de l'agar) est réparti dans des tubes à essai de 7 ml de milieu, après stérilisation du milieu dans l'autoclave, les têtes des tubes à essai sont posés sur un support horizontale (une burette endormie par exemple) afin d'obtenir des surfaces inclinées en tubes bien gélifiées (remarque : nous pouvons augmenter la concentration de l'agar pour s'assurer de la gélification du milieu jusqu'à 20 à 22 g/l).

2.3. PRODUCTION DU BIOÉMULSIFIANT

2.3.1 Préparation de la préculture

La préculture de la souche Sdk644a été préparée dans le milieu LB. Sa composition (g/l d'eau distillée) est : 10 peptone, 5 extrait de levure et 23 NaCl. Le pH du milieu a été ajusté à 7 avec une solution de NaOH de 1 mol/l. Après stérilisation à 120 °C pendant 20 min et refroidissement de milieu, nous avons ajouté une petite quantité de colonies de la souche Sdk644 nouvellement repiquée à l'aide d'une anse de platine dans la zone stérile autour d'un bec de bunsen. Les flaconsensemencés sont incubés à 30 °C pendant une nuit.

2.3.2 Milieux de production

La production de bioémulsifiant est faites dans deux milieux différents ; un milieu des sels minéraux (MSM) et un milieu riche (LB).

2.3.2.1 Milieu des sels minéraux (MSM)

Sa composition est la suivante (g/l d'eau distillée) : 23 NaCl ; 0,7 KH₂PO₄ ; 0,9 Na₂HPO₄ ; 2 NaNO₃ ; 0,4 MgSO₄ ; 0,1 CaCl₂.2H₂O ; 0,001 FeSO₄.7H₂O et 1 ml d'une solution d'éléments traces métalliques contenant (g/l d'eau distillée) : 0,5 MnSO₄.H₂O ; 0,7 ZnSO₄.7H₂O ; 0,26 H₃BO₃ ; 0,06 Na₂MoO₄.2H₂O ; 0,5 CuSO₄.5H₂O. Le pH du milieu est ajusté à 7 avec une solution de 1 mol/l NaOH. Un volume de 100 ml de

milieu est distribué dans des erlenmeyers de 500 ml. Les erlenmeyers sont bouchés à l'aide du coton cardé couvert par du papier aluminium, puis stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 min.

Afin de prévenir les problèmes de précipitation des sels après autoclavage du milieu, le MgSO_4 , le CaCl_2 et le FeSO_4 sont stérilisés (par autoclavage aux mêmes conditions) et ajoutés séparément avec le milieu MSM dans des conditions aseptique (sous bec bunsen). Pour cela, des volumes déterminés prélevés à partir des solutions mères de chaque élément sont ajoutés dans le milieu MSM afin d'obtenir les concentrations souhaitées (C.-à-d. 0,4 g/l MgSO_4 ; 0,1 g/l CaCl_2 et 0,001 g/l FeSO_4).

La source de carbone est ajoutée au milieu soit directement avec les composants du milieu soit séparément.

Le milieu de production est incubé à 30°C sous une agitation de 150 tr/min pendant 40 heures dans un incubateur-agitateur de marque DAIHAN SCIENTIFIC WISE CUBE WIS-010.

2.3.2.2 Milieu riche (LB)

De la même façon, nous avons essayé de produire le bioémulsifiant à partir du milieu LB. Le milieu est préparé de la même manière décrite pour la préparation de la préculture. Ensuite, il est distribué dans les erlenmeyers de 500 ml avec un volume effectif de 100 ml.

La source de carbone inductrice de la production est ajoutée avec la composition du milieu ou stérilisée séparément, puis ajoutée dans le milieu.

Le milieu de production a été incubé à 30°C sous une agitation de 150 tr/min pendant 16 heures.

2.3.3 Facteurs influençant la production du bioémulsifiant

2.3.3.1 Source de carbone

Deux sources de carbone ont été testées ; le glycérol à raison de 2 % (v/v) et le glucose à une concentration de 2 % (m/v). Le glycérol a été additionné avec les éléments des milieux MSM ou LB avant stérilisation, tandis que le glucose a été introduit séparément après stérilisation d'une solution mère de glucose sur filtre seringue de 0,22 μm . Dans ce cas, les

éléments des milieux (LB et MSM) sont préparés en doubles concentrations puis mélangés volume par volume (v/v) avec une solution de glucose de double concentration (c.-à-d. 4% m/v). Comme ça, le mélange des deux solutions se trouvera à sa concentration finale (2 %, v/v).

2.3.3.2 Source d'azote

Deux sources d'azote ont testés dans le cas du milieu MSM ; le chlorure d'ammonium (NH_4Cl) et le nitrate de sodium (NaNO_3). Les deux sources sont employées à une concentration de 0,2 % (m/v) et introduites directement avec les ingrédients du milieu.

2.3.3.3 Rapport C/N

Le rapport C/N est équivalent à la concentration de la source de carbone (g/l) rapporté sur différentes concentrations de la source d'azote (0,5 ; 1 ; 2 ; 4 et 6 g/l) afin d'obtenir les rapports suivants (g source de carbone/g source d'azote) : 50,4 ; 25,2 ; 12,6 ; 6,3 et 4,2.

Cette fois-ci, des solutions mères de chaque concentration sont préparées et stérilisées (par autoclavage à 120 °C pendant 20 min) séparément. Ensuite, un volume déterminé des solutions mère et ajouté au milieu MSM pour obtenir les concentrations finales.

2.3.3.4 Effet de la salinité

L'effet des sels sur la production de bioémulsifiant a été évalué dans le milieu MSM additionné de NaCl (23 g/l) et dans un autre milieu MSM dépourvu de sel (0 g/l de NaCl).

2.3.3.5 Influence de la nature du milieu

L'influence du milieu a été évalué dans deux milieux ; riche (LB) et pauvre ou minimum (MSM) avec la meilleure source de carbone, d'azote et le meilleur rapport C/N dans le cas du milieu MSM.

2.3.3.6 Cinétique de production

Après sélection des meilleures sources de carbone, d'azote et du rapport C/N, nous avons suivi la production de bioémulsifiant dans les deux milieux, pratiquement chaque 12 heures. Les milieux de culture sont préparés de la même façon décrite auparavant. Des prélèvements réguliers du surnageant sont prises pour évaluer les paramètres suivants :

La croissance bactérienne (DO à 600 nm), l'activité émulsifiante (E24), l'activité de surface (DDP), et la tension de surface (TS).

2.4. EVALUATION DE LA PRODUCTION DU BIOÉMULSIFIANT

La détection de bioémulsifiants a été évaluée principalement par l'indice d'émulsification (E24). Eventuellement, nous avons opéré deux techniques pour évaluer l'activité de surface : le test de déplacement de pétrole (DDP) et la mesure de la tension de surface (TS). Ainsi, la croissance bactérienne de la souche a été surveillée pour déterminer à quelle phase de croissance la production est maximale. Cette dernière est estimée par mesure de la densité optique du bouillon de culture à une longueur d'onde de 600 nm (il s'agit pas d'une mesure de l'absorbance d'un soluté à sa longueur d'onde maximale mais plutôt une mesure conventionnel du trouble microbien).

Pratiquement, un volume de 20 ml de la culture microbienne a été centrifugé à 6000 tr/min pendant 15min. Le surnageant ainsi récupéré est filtré sur papier filtre ordinaire. Le volume de surnageant utilisé dépend de la technique de mesure employée (E24, TS ou DDP).

2.4.1 Indice d'émulsification (E24)

L'émulsification est estimée par l'indice d'émulsification E24 selon le protocole développé par Cooper et Goldenberg (1987) [75]. En effet, 2 ml du surnageant de culture est ajoutée à 2 ml d'un substrat hydrophobe (gasoil ou autre) dans un tube à essai, le mélange est bien agité au vortex de marque VTX 400, à vitesse maximale pendant 2 min jusqu'à l'obtention d'une émulsion homogène, puis laisser au repos pendant 24 h avant de prendre la mesure.

L'indice d'émulsification (E24) est défini comme étant le rapport entre la hauteur de l'émulsion (H_e) formée et la hauteur totale (H_T) du mélange (la figure 2.1). Il est exprimé en pourcentage comme l'indique la formule suivante : $E24(\%) = \frac{H_e}{H_T} \times 100$

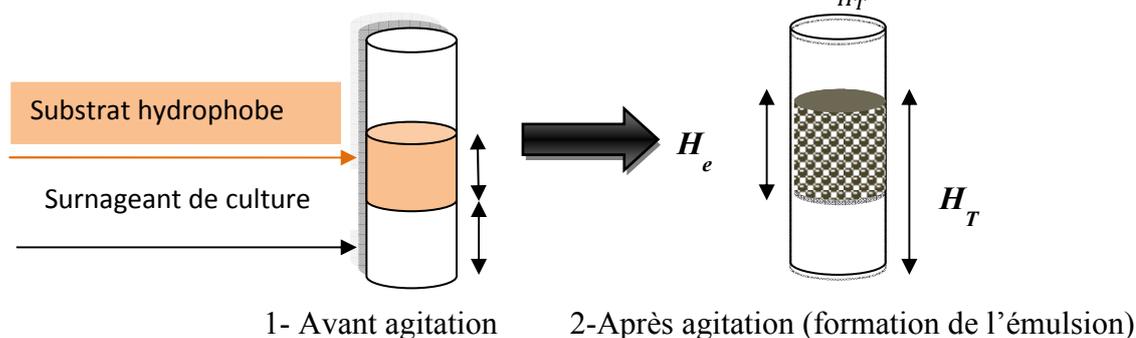


Figure 2.1 : Mesure de l'indice d'émulsification.

2.4.2 Test de déplacement de pétrole (DDP)

Cette méthode est basée sur la caractéristique de bioémulsifiant à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau. La force de surface du bioémulsifiant est capable de déplacer l'huile. La méthode décrite ci-dessous est basée sur celle déjà décrite par Morikawa *et al*, 1993 [76], avec petites modifications.

Dans une boîte de Pétri contenant 20 ml d'eau distillée, nous ajoutons deux gouttes de pétrole brut à l'aide d'une pipette pasteur. Ensuite, une goutte du surnageant de culture est légèrement placée au centre du film de pétrole. Le diamètre (en cm) de la surface halo claire est mesuré après 30 secondes. Plus le diamètre est grand, plus l'activité de surface du bioémulsifiant est importante (Figure 2.2).



Etape 1 : Couche huileuse de pétrole



Etape 2 : Effet de l'ajout d'un bioémulsifiant sur le pétrole (formation du halo-clair)

Figure 2.2: Prises photos descriptives du test de déplacement de pétrole.

2.4.3 Tension de surface (TS)

La mesure de la tension de surface a été réalisée à l'aide d'un tensiomètre de marque GIBERTINI TSD 132389, Italie, qui détermine la tension de surface ou interfaciale. Ce dernier est doté d'une sonde idéale, permettant un mouillage parfait quels que soient les liquides étudiés. Le périmètre de mouillage de la sonde étant parfaitement défini et connu (longueur de la lame). Nous pouvons utiliser la force mesurée pour calculer la tension de surface ou interfaciale.

Un volume d'environ 15 ml de surnageant de culture est nécessaire pour la mesure de la tension de surface.

2.5. EXTRACTION DE BIOÉMULSIFIANT

2.5.1 Élimination de la biomasse

La production de bioémulsifiant après sélection des meilleures conditions, a été réalisée dans un erlenmeyer de 5 litres, avec un volume opérationnel de 1 litre. Le bioémulsifiant BioE644 a été synthétisé par la souche bactérienne Sdk644 dans les deux milieux MSM et LB avec le glycérol comme source de carbone. Eventuellement, le BioE644 a été produit à partir de l'huile de friture avec le milieu MSM dans les mêmes conditions afin de comparer le pouvoir émulsifiant de chacun d'eux. Après atteinte du temps optimal et lorsque l'activité émulsifiante est maximale dans le milieu (cela est vérifié par un calcul du E24), le volume entier du bouillon de culture est éliminé de la biomasse par centrifugation (centrifugeuse de marque CENTURION SCIENTIFIC K3SERIES), à une vitesse de 6000tr/min pendant 15min, suivie par une filtration sur papier filtre ordinaire.

2.5.2 Méthodes d'extraction

Le surnageant de culture (qui contient le bioémulsifiant) est partiellement purifié selon les protocoles suivants :

2.5.2.1 Précipitation par l'éthanol

Cette méthode est très recommandée pour les bioémulsifiants avec un taux de glucides élevé, du fait qu'elle résulte d'une faible fixation des sels avec les polysaccharides des bioémulsifiants, contrairement à la méthode de précipitation avec le sulfate d'ammonium. Ainsi, la méthode est destinée à une large gamme de bioémulsifiants à structures inconnues [77]. Les étapes d'extraction en employant cette méthode sont résumées comme suit :

1. Lyophiliser du surnageant (dans notre cas nous l'avons séché à une température de 50 °C au lieu de la lyophilisation),
2. Reconstituer le produit dans l'eau distillée, et l'ajouter de l'éthanol absolu (4v éthanol/1v eau). Laisser se précipiter à 4 °C pendant une nuit,
3. Centrifuger la suspension (6000 tr/min pendant 30 min à 4 °C) pour récupérer le culot (qui constitue le produit),
4. Evaporer l'éthanol résiduel par flux d'azote (nous avons utilisé le séchage à 30 °C),

5. Dissoudre le produit dans un volume minimal d'eau distillée et le dialyser en utilisant un tube de dialyse avec coupure de poids moléculaires entre 6 à 12 kDa.
6. Après 24 h, éliminer le dialysat et répéter l'opération avec une eau distillée fraîche pour une 24 h supplémentaire.
7. A la fin, lyophiliser le produit.

Remarque :

1. les étapes entre 5 à 7 n'ont pas pu être réalisées.
2. Nous avons adopté une version modifiée de cette méthode, du fait qu'elle donne une meilleure activité émulsifiante par rapport à la précédente. La méthode est largement citée dans la littérature[78,79, 80].

Nous mettons le volume de surnageant dans un erlenmeyeret nous l'ajoutons de l'éthanol (remplie dans une burette gradué)goute à goutte. L'erlenmeyer est placé sous agitation magnétique. Le surnageant est précipité avec 3 volumes d'éthanol contre un volume de celui-ci. La précipitation est favorisée par le froid en mettant de la glace autour de l'erlenmeyer qui contient le surnageant.

La solution obtenue est laissée au réfrigérateur à 4 °C pendant une nuit. Elle ensuite centrifugée au froid (à une température de 4 °C) pour récupérer le produit. Enfin, le produit est solubilisé dans un volume minimal d'eau distillée, séché (il devrait être lyophilisé) puis pesé.

2.5.2.2 Extraction par solvants

Cette méthode est destinée généralement pour extraire les biosurfactants de faibles poids moléculaires, elle est utilisée dans notre cas en comparaison avec les méthodes conventionnelles d'extraction des bioémulsifiants, dont en est dépourvu des équipements essentiels pour compléter l'opération (lyophilisation et dialyse). Le but recherché est d'avoir un rendement d'extraction plus élevé et/ou une capacité émulsifiante plus importante.

Deux solvants sont généralement utilisés pour l'extraction des biosurfactants : l'acétate d'éthyle et le mélange chloroforme : méthanol (2:1, v/v). Les deux solvants ont été utilisés

dans nos expérimentations pour l'extraction. Le protocole d'extraction est détaillé ci-dessous :

1. Extraire le surnageant avec un volume égal de solvant dans une ampoule à décanter, boucher hermétiquement l'ampoule et l'agiter jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de gaz dégagé (cela est vérifié en retournant l'ampoule à l'envers et en ouvrant de temps en temps le robinet de l'ampoule pour permettre le dégazage des vapeurs de solvant). Laisser les deux phases (aqueuse et organique) se séparent entièrement (une durée de 15 à 20 min généralement suffisse).
2. Récupérer la phase organique contenant le produit (la couche supérieure dans le cas de l'acétate et inférieure dans le cas du mélange).
3. Répéter à nouveau l'extraction de la phase aqueuse (récupérée) avec le solvant en répétant la même opération précédente. Combiner les deux phases organiques extraites.
4. Eliminer les traces d'humidité, en passant la phase organique sur papier filtre garnie du sulfate de sodium anhydre.
5. Evaporer le solvant dans évaporateur rotatif sous vide (de type Rotavap à une température de 40 °C) jusqu'à un volume minimal. Transvaser dans une boîte de pétri en verre et rincer le ballon (utilisé dans l'évaporation) avec un volume supplémentaire de solvant pour récupérer le résidu du produit, combiner-le dans la boîte de pétri et laisser se sécher à température ambiante sous la hotte.
6. A la fin, peser la quantité du produit obtenu et calculer la concentration de bioémulsifiant par rapport à un litre de bouillon de culture.

2.6. PROPRIÉTÉS DU BIOÉMULSIFIANT

2.6.1 Propriétés fonctionnelles

2.6.1.1 Stabilité du bioémulsifiant

La stabilité du bioémulsifiant a été suivie par l'indice d'émulsification E24. Le surnageant testé est produit à dans trois milieux : MSM et LB avec le glycérol et le MSM additionné de l'huile de friture (2%, v/v).

➤ **Thermostabilité**

La thermostabilité du bioémulsifiant a été réalisée par incubation des solutions de surnageant (4 ml) à différentes températures : à 100 °C pendant 1 heure, au froid (environ + 4°C) et par congélation (environ – 12°C) pendant une nuit. L'indice d'émulsification est mesuré par la suite à la température ambiante.

➤ **Stabilité acido-basique**

L'effet du pH a été déterminé en faisant varier le pH du surnageant (un volume de 4 ml) dans la gamme suivante : 2, 4, 7, 9 et 12, en utilisant des solutions de HCl ou de NaOH de 1 mol/l. L'indice d'émulsification E24 est mesuré par la suite.

➤ **Durabilité de l'émulsion**

La stabilité de l'émulsion en fonction du temps est ainsi évaluée. Du bioémulsifiant BioE644 produit à partir du milieu LB-glycérol (à une concentration de 0,6 % m/v) est extrait avec les différents solvants (Acétate d'éthyle, Mélange chloroforme : méthanol, éthanol). L'émulsion produite a été surveillée en fonction du temps jusqu'à sa disparition complète.

2.6.1.2 Pouvoir émulsifiant

Les propriétés émulsifiantes des différents surnageants isolés à partir du milieu MSM additionné de glycérol, de l'huile de friture et du milieu LB additionné de glycérol sont testés vis-à-vis des substrats hydrophobes diversifiés (huile d'avoine, huile de pin, huile d'olive, huile de table, huile de moteur, pétrole 1 issu directement d'un forage à HassiMesseoud, pétrole 2 issu de la raffinerie de Berraki, toluène, dichlorométhane et hexane). Un témoin d'eau distillée avec chaque substrat hydrophobe est préparé en parallèle.

Un volume de 2 ml des surnageants est ajouté à 2 ml des substrats hydrophobes et vortexé à vitesse maximale pendant 2 min. Le pouvoir émulsifiant des surnageants vis-à-vis les substrats hydrophobes est surveillé après 10 min et 24 h de repos.

2.6.2 Propriétés structurales

2.6.2.1 Composition biochimique

La composition biochimique du bioémulsifiant BioE644 produit à partir du milieu LB-glycérol après son extraction par le mélange chloroforme : méthanol a été déterminé en utilisant les méthodes suivantes :

- Détermination des carbohydrates (les glucides) : essai colorimétrique (phénol-acide sulfurique)

Les glucides ont été déterminés en utilisant la méthode de Duboiet *al.* 1956 [81] adoptées aux bioémulsifiants [77,57].

- 1- Hydrolyser le bioémulsifiant par ajout de 15 mg à 150 ml d'une solution de HCl à 0,5 mol/l préparée dans le méthanol. Chauffer à 65 °C pendant 16 heures. La réaction est réalisée dans un dispositif contenant un chauffe-ballon et un système de refroidissement à reflux (figure 2.3) pour prévenir la perte des vapeurs du méthanol (le méthanol s'évapore à 65 °C).
Sécher sous flux d'azote sinon au rotavap.

- 2- Préparation de la courbe d'étalonnage :

Préparer une solution de glucose de 0,0175 % (m/v) et une autre solution de phénol 5% (v/v).

Cinq concentrations de glucose sont préparées à partir de la solution mère, en mettant 0 ml ; 2,5 ml ; 5 ml, 7,5 ml et 10ml dans des tubes à essai et en complétant à 10 ml avec de l'eau distillée. Nous prendrons par la suite 500µl de chaque solution précédente et nous l'ajoutons 1ml de la solution de phénol et 5ml de H₂SO₄ concentré. Les tubes sont placés au bain Marie à 30°C pendant 20minutes et refroidis à température ambiante. L'absorbance de chaque étalon est mesurée à 485 nm.

- 3- Pour les échantillons, dissoudre 5 mg (de bioémulsifiant hydrolysé) dans 1 ml d'eau distillée, prendre 500 µl de cette solution et l'ajouter 1 ml de réactif de phénol et 5ml d'acide sulfurique concentré, le tubes est placés au bain Marie à 30°C pendant 20minutes, refroidis à température ambiante et l'absorbance est mesurée à 485nm. La concentration des sucres (équivalent de glucose) est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage.

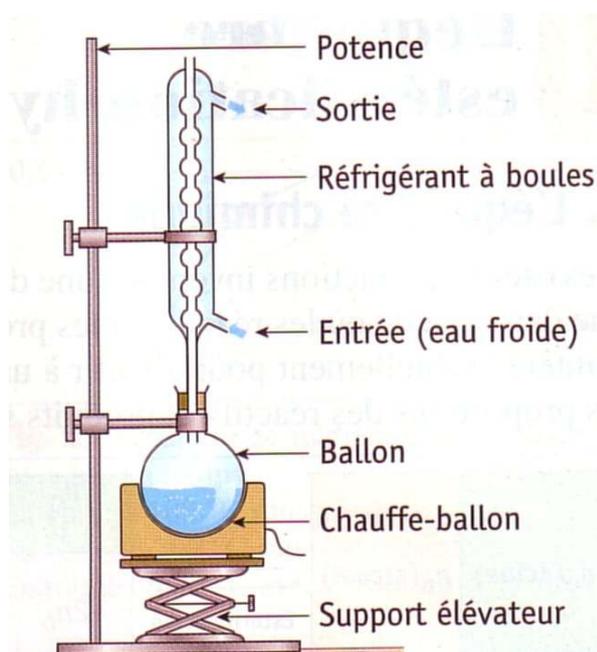


Figure 2.3: Dispositif à reflux pour l'hydrolyse des carbohydrates.

➤ Dosage des lipides

Le contenu en lipides a été estimé gravimétriquement selon la méthode de Manocha décrite par Santos *et al*, (2013) [82].

Peser 0,5 g de bioémulsifiant et l'extraire séquentiellement avec 5 ml d'un mélange de chloroforme :méthanol (1:1, v/v) dans un tube à essai. Bien agiter (manuellement) jusqu'à atteindre la solubilité maximale. Sécher au rotavappuis reprendre l'extraction avec 5ml d'un mélange de chloroforme :méthanol (1:2, v/v). Sécher au rotavap et mesuré le poids résiduel du bioémulsifiant.

Le contenu en lipides est calculé par la formule suivante :

$$\text{Lipides (\%)} = \frac{(0,5 - m_1)}{0,5} \times 100$$

m_1 : étant le poids résiduel du BioE644 (g).

L'essai est réalisé avec deux répliques indépendantes.

2.6.2.2 Chromatographie sur couche mince (CCM)

La CCM est une technique employée pour l'analyse de mélange des composés par séparation de ceux-ci du mélange. Les étapes de la chromatographie sur couche mince consistent en : (1) le tacher ou *spotting*, (2) le développement et (3) la visualisation. Les composés du mélange préparés dans un solvant adéquat se migrent le long de la plaque sous l'influence d'un éluant qui les chariots. La distance parcourue de chaque composé est fonction de sa polarité, qui traduit son affinité vis-à-vis la phase stationnaire (la plaque de gel de silice) et la phase mobile (l'éluant). Après développement des taches (spots) sur la plaque, arrivera la visualisation. Cette étape consiste à teinter la plaque avec des agents révélateurs spécifiques à chaque groupe chimique.

La CCM est largement utilisée pour l'identification du type de biosurfactant isolé (lipopeptide, glycolipide, ...)[83, 84, 85], ainsi que pour une identification préliminaire des groupements chimiques (lipides, glucides, phospholipides, amines, ...) des composés de faibles poids moléculaires, en utilisant une variété de phases mobiles et d'agents révélateurs [10].

Un paramètre caractéristique en CCM est le rapport frontal ou le facteur de rétention (R_f), celui-ci détermine la distance parcouru par le composé (Y), rapporté à la distance jusqu'au front de solvant (X) (figure 2.4), comme l'exprimé par la formule suivante : $R_f = \frac{Y}{X}$ (R_f est toujours ≤ 1).

Chaque composé dans le mélange est déplacé avec son propre R_f .

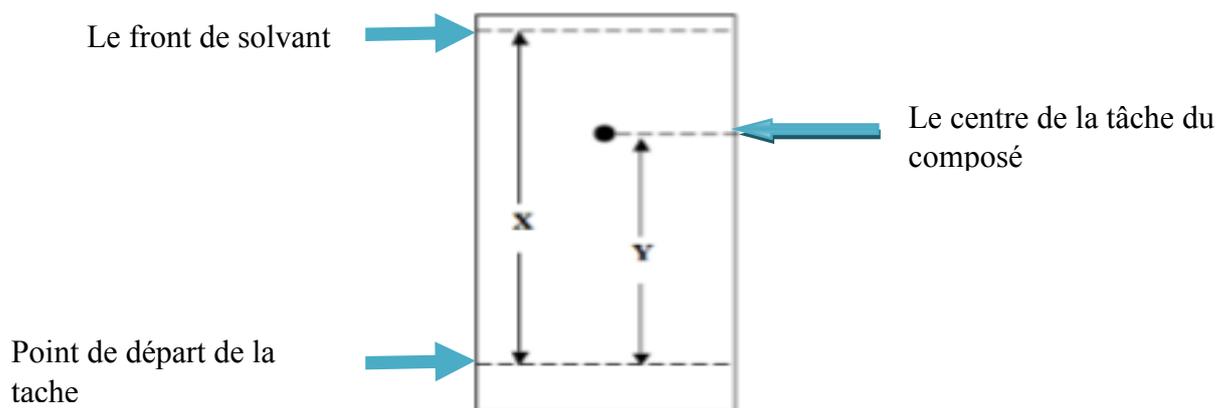


Figure 2.4: Schéma explicatif du rapport frontal (R_f).

Le protocole que nous avons suivi pour opérer la CCM est tiré de la synthèse des travaux de Smyth *et al.* (2016, *a et b*) [57,77] avec une légère modification :

➤ Préparation de la chambre de migration

La chambre de migration est une cuve parallélépipédique en verre (figure 2.5) muni d'un couvercle. La chambre doit être saturée en vapeurs de solvant de la phase mobile avant de commencer l'expérience. 100 ml d'un mélange de chloroforme : méthanol : eau (65 : 25 : 4, v/v/v) utilisée comme phase mobile est versé dans la chambre ; 45 min avant le commencement.

➤ Préparation de la plaque, *spotting* et développement

Nous avons utilisé une plaque de gel de silice de dimension ($L \times l$) de (5 × 10 cm) de type F254 (70-230 mesh, ASTM, Merck, Germany). La plaque est lavée deux fois au préalable avec un mélange de chloroforme : méthanol (1:1, v/v) et met à l'étuve à une température de 120 °C pendant 10 min pour l'activer. Du bioémulsifiant BioE644 (une petite quantité) est ensuite solubilisé dans le méthanol. Un volume de 10 µl de la solution de BioE644 est déposé au centre de la plaque à une longueur d'environ 1,5 cm au-dessus de la base de la plaque. Une fois la solution de BioE644 est séchée, nous introduisons la plaque dans la chambre pour permettre la séparation des composés du mélange (s'il y a plusieurs composés) (figure 2.5). Cette étape prend fin lorsque le solvant de développement atteint un niveau précis (appelé le front de solvant), qui se situe à moins de 1 cm le haut de la plaque. Les plaques sont sorties de la chambre et laissées se sécher sous la hotte afin de procéder à l'étape suivante.

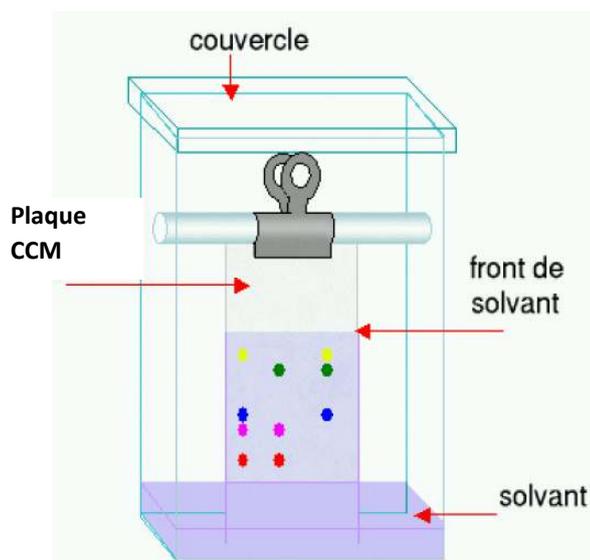


Figure 2.5 : Schéma d'une chambre de CCM avec ses différents composants.

➤ Visualisation ou révélation

Nous avons testé la présence de trois groupements chimiques que constituent généralement les biosurfactants/bioémulsifiants : les sucres, les lipides et les acides aminés.

La détection des sucres est révélée par le réactif anthrone qui donne un complexe bleu-vert avec les composés furfurals et hydroxyméthyl-furfurals obtenus après une étape d'hydrolyse des polysaccharides en monosaccharides et une déshydratation par la suite. La réaction a eu lieu en milieu acide fort et par chauffage[77,86].

Le réactif anthrone est préparé en ajoutant 0,125 g d'anthrone à 63 ml d'acide sulfurique concentrée (à 98 %) et 25 ml d'eau distillée. L'acide sulfurique est versé délicatement dans un erlenmeyer contenant de l'eau distillée et de l'anthrone, sous agitation magnétique, dans un récipient garni de glace. Le réactif anthrone ainsi préparé est rempli dans un pulvérisateur qui jet des fines gouttelettes.

Les plaques développées sont pulvérisées avec le réactif anthrone, laissées se séchées sous la hotte puis incubées à l'étuve à une température de 110 °C pendant 20 min. Les plaques révélées sont sorties de l'étuve et mises directement au dessiccateur pour arriver à la température ambiante. Dans le cas de la présence des sucres, les spots prends une couleur bleu-verte[77]. Une plaque tachée d'une solution de glucose (0,5 g/l) a été préparée dans les mêmes conditions et servie comme test positif.

La révélation des acides aminés se fait avec le réactif de Ninhydrine. Ce dernier est préparé en dissolvant 0,25 g dans 100 ml d'acétone à 99 %. Après pulvérisation, les plaques sont mises à l'étuve à une température de 110 °C pendant 20 min pour donner l'apparition des taches rougeâtres dans le cas d'un test positif.

Les lipides, quant à eux, sont révélés par le bleu de bromothymol. Ce réactif est préparé en dissolvant 0,1 % (m/v) dans 10 % (m/m) d'éthanol absolu. La solution est virée en bleu en ajoutant au fur et à mesure du NaOH. Les composés développés sont pulvérisés par le bleu de bromothymol, qui donne des spots jaunes juste après séchage sous la hotte [57].

Remarque : afin de confirmer la présence ou l'absence des groupements recherchés, le test colorimétrique est reproduit en tubes à essai contenant 1 ml d'agents révélateurs et 0,2 ml de solution de BioE644, ainsi que de contrôle positif (solution de glucose et de lactosérum à 0,5 g/l) ou de contrôle négatif (de l'eau distillée au lieu de la solution de BioE644). Les mélanges sont chauffés dans un bain marie porté à ébullition pendant 10 min. Les lipides sont révélés sans chauffage.

2.6.2.3 Analyse par infrarouge IRRTA

Les spectres infrarouges ont été obtenus en utilisant un spectrophotomètre infrarouge à réflexion totale atténuée série 4000-400 de marque ALPHA BRUKER (c'est une analyse par réflectance totale atténuée sans préparation de l'échantillon). Une quantité de 5 mg de bioémulsifiant a été disposée sur la plaque en inox de l'appareil d'infrarouge.

Les mesures d'absorption optique ont été effectuées dans les domaines moyen-IR dont les longueurs d'onde sont comprises entre 500 et 4000 cm^{-1} , avec un temps de scan de 32 scans et une résolution de 2 cm^{-1} .

3.1. PRODUCTION DU BIOÉMULSIFIANT

3.1.1 Influence des principaux facteurs sur la production du bioémulsifiant

La production de bioémulsifiant est influencée par divers facteurs environnementaux, comme les sources de carbone et d'azote, le rapport C/N, le pH, la salinité, etc. Les facteurs que nous avons choisis pour en sélectionner les meilleurs résultats ont une influence significative sur la production du bioémulsifiant. En particulier, la source de carbone et le rapport C/N.

3.1.1.1 Influence de la source de carbone

Le type et la quantité de bioémulsifiant produit dépendent fortement de la nature de la source de carbone utilisée [87,88]. Les sources de carbone généralement utilisées dans la production de bioémulsifiants peuvent être divisées en trois catégories : les glucides, les hydrocarbures et les huiles végétales [89]. Également, plusieurs sources de carbone ont été associées pour une meilleure production de bioémulsifiants [90].

Dans notre cas, nous avons utilisé deux sources de carbone solubles dans l'eau : le glucose (2%, m/v) et le glycérol (2%, v/v), la figure 3.1 présente l'influence de la source de carbone sur le maximum de la croissance bactérienne, de l'activité de surface et de l'activité émulsifiante. Le tableau 3.1 présente les cinétiques de croissance (DO à 600 nm) et de production (activité émulsifiante E24) influencées par la source de carbone.

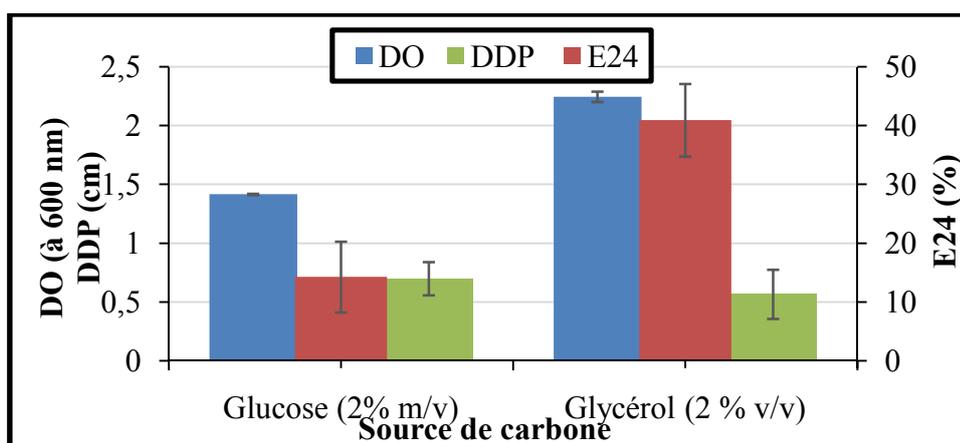


Figure 3.1 : Influence de la source de carbone sur la croissance bactérienne (DO à 600 nm), l'activité de surface (DDP en cm) et l'activité émulsifiante (E24 en %) dans le milieu de production MSM. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de trois répliques indépendantes.

Tableau 3.1 : Effet de la source de carbone sur les cinétiques de croissance et de production du bioémulsifiant.

Temps (h)	Sources de carbone			
	Glycérol		Glucose	
	DO à 600 nm	E24 (%)	DO à 600 nm	E24 (%)
7	0,6814 ± 0,081 _a	16,87 ± 26,2 _c	0,7393 _b	0 _b
16	2,1342 ± 0,057 _a	29,76 ± 29,6 _c	1,41 _b	3,5 _b
23	2,1220 ± 0,032 _a	38,48 ± 22,15 _c	1,4199 _b	10 _b
40	2,2685 ± 0,019 _c	40,92 ± 6,17 _c	1,4125 ± 0,005 _b	14,26 ± 6,01 _c

_a : Moyenne de deux répliques indépendantes. _b : un seul réplique. _c : trois répliques indépendantes.

Les résultats obtenus montrent que l'ajout du glycérol améliore fortement la croissance bactérienne (DO). Par exemple, les valeurs de la DO sont 2,2 en présence de glycérol et 1,4 en présence de glucose. De l'autre côté, le glycérol a augmenté trois fois l'activité émulsifiante (E24) par rapport au glucose. La valeur de l'indice d'émulsification E24 a augmenté de 13% à 40 % en remplaçant le glucose par le glycérol. En revanche, l'activité de surface dans les deux milieux est presque identique.

L'utilisation du glycérol comme source de carbone, permet d'obtenir un rendement plus élevé en biosurfactants. D'une part, les bactéries acidifient le milieu en consommant le glycérol, ce qui rend le pH favorable à la production, d'autre part la biomasse bactérienne sera importante pour assumer la dégradation [91]. En outre, le glycérol semble être un précurseur d'acide gras simple avec une grande solubilité dans le milieu, de sorte qu'il est facilement utilisé par les bactéries pour leur carbone et leur source d'énergie [92].

Des résultats similaires ont été trouvés par Anna et Parthasarathi (2014) [92]. En présence de *Pseudomonasaeruginosa* PBSC1 et en utilisant le glycérol et le glucose comme deux sources de carbone. Ils ont montré que le milieu MSM avec le glycérol conduit à une production plus élevée de biosurfactant (3,93 g/l) par rapport au milieu contenant le glucose (3,27). La réduction minimale de la tension de surface et l'activité d'émulsification

maximale enregistrées étaient de 30,25 mN/m et 79,65% respectivement. Une bonne formation de mousse a été observée dans le milieu de culture contenant du glycérol.

Santaet *al* (2002) [93], ont trouvé aussi qu'avec la souche PA1 de *Pseudomonas aeruginosa* cultivées sur différentes sources de carbone (n-hexadécane, huile de paraffine, glycérol et huile de babassu), le glycérol était le meilleur.

3.1.1.2 Influence de la source d'azote

Il est prouvé que les sources d'azote jouent un rôle essentiel dans les processus de synthèse de bioémulsifiants [94].

La source d'azote est le deuxième complément le plus important pour la production de bioémulsifiants. Diverses sources d'azote organiques et inorganiques ont été utilisées dans la production de bioémulsifiants [95]. Dans notre cas, deux substrats ont été utilisés : le nitrate de sodium NaNO_3 et le chlorure d'ammonium NH_4Cl avec une concentration de 2g/l pour les deux sources. La figure 3.2 montre l'effet de la source d'azote sur le maximum de la croissance bactérienne, l'activité émulsifiante et l'activité de surface. Le tableau 3.2 montre l'effet de la source d'azote sur les cinétiques de croissance et de production de bioémulsifiant.

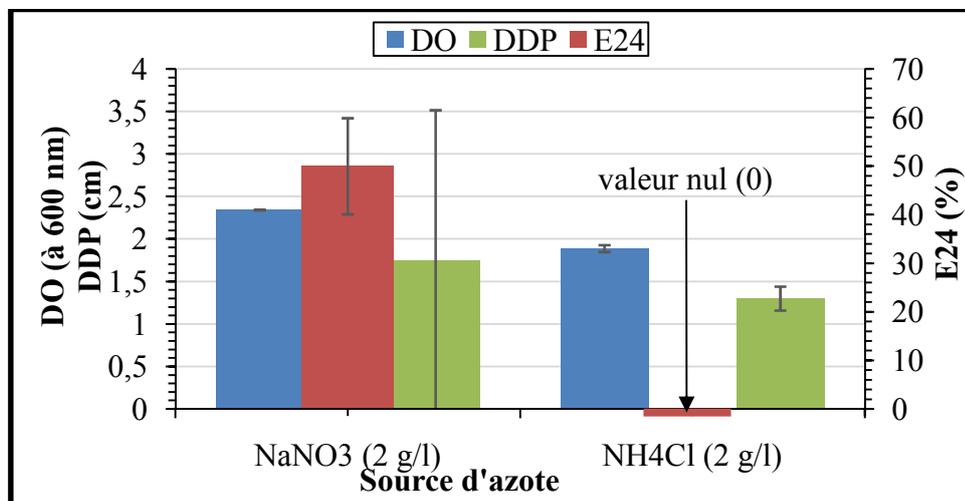


Figure 3.2 : Influence de la source d'azote sur la croissance bactérienne (DO à 600 nm), l'activité de surface (DDP en cm) et l'activité émulsifiante (E24 en %) dans le milieu de production MSM. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de deux répliques indépendantes.

Tableau 3.2 : Effet de la source d'azote sur les cinétiques de croissance et de production de bioémulsifiant.

Temps (h)	Sources d'azote			
	NaNO ₃		NH ₄ Cl	
	DO à 600 nm	E24 (%)	DO à 600 nm	E24 (%)
7	0,6182 ± 0,11 _b	7,07 ± 6,06 _b	0,6087 ± 0,023 _a	0 _a
16	2,2879 ± 0,09 _b	34,53 ± 27,68 _b	0,1063 ± 0,056 _a	0 _a
23	2,1460 ± 0,068 _b	33,06 ± 18,27 _b	2,203 ± 0,13 _a	0 _a
40	2,2040 ± 0,12 _a	50 ± 9,90 _a	2,1298 ± 0,02 _a	0 _a

_a : Moyenne de deux répliques indépendante. _b : Moyenne de trois répliques indépendante.

Les résultats obtenus révèlent que le nitrate de sodium est une excellente source d'azote pour la production du bioémulsifiant, l'activité émulsifiante (E24) est de 50%. Concernant la croissance bactérienne, le NaNO₃ a provoqué un développement cellulaire plus important par rapport au NH₄Cl; les valeurs de la DO sont 2,4 et 1,9 pour NaNO₃ et NH₄Cl respectivement. De l'autre côté, l'activité de surface de deux milieux sont proches. Un DDP en cm de 1,75 et 1,3 pour le NaNO₃ et le NH₄Cl respectivement.

Par conséquent, les résultats montrent que le NaNO₃ est la bonne source d'azote pour une bonne production de bioémulsifiant. Il semblerait que le nitrate de sodium est facilement assimilable par les bactéries.

Abdel-Mawgoud *et al.* (2008) [96] et Meyer (2011) [97] ont trouvé des résultats similaires, ils ont signalés que la bonne production de bioémulsifiant a été obtenue dans le cas où le nitrate d'ammonium et le nitrate de sodium sont utilisés comme source d'azote.

D'autre part, Anna et Parthasarathi, (2014) [92], ont montré que le nitrate de sodium conduit à une bonne production de biosurfactant.

3.1.1.3 Influence du rapport C/N

Dans de nombreux processus biologiques, le rapport C/N est un facteur critique, affectant l'accumulation des produits métaboliques [98].

Pour avoir des rendements de production optimaux, il est donc nécessaire d'optimiser le rapport C/N. Les rapports C/N étudiés sont : 50,4 ; 25,2 ; 12,6 ; 6,3 ; 4,2. Les deux sources de carbone et d'azote sont le glycérol et le nitrate de sodium NaNO_3 . Les résultats de l'activité émulsifiante et de surface maximales sont illustrés dans la figure 3.3. Le tableau 3.3 montre les cinétiques de croissance et de production de bioémulsifiant.

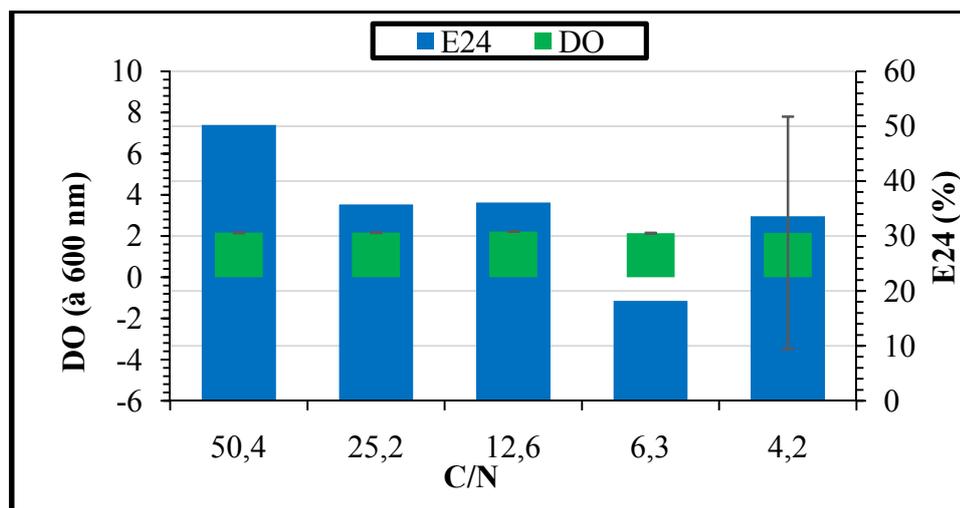


Figure 3.3 : Influence du rapport C/N sur la croissance bactérienne (DO à 60 nm) et l'activité émulsifiante (E24 en %) dans le milieu de production MSM. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de deux répliques indépendantes seulement pour la série « DO ».

Tableau 3.3 : Effet du rapport C/N sur les cinétiques de croissance et de production du bioémulsifiant.

Rapport C/N	Temps (h)					
	7		16		23	
	DO à 600 nm	E24 (%)	DO à 600 nm	E24 (%)	DO à 600 nm	E24 (%)
4,2	1,1241 ± 0,06 _a	12,4 ± 1,8 _a	2,1697 ± 0,02 _a	50,24 ± 5,38 _a	2,1384 ± 0,02 _a	26,25 ± 5,69 _a
6,3	1,5865 ± 0,55 _a	12,3 ± 12 _a	2,1632 ± 0,007 _a	35,78 ± 27,96 _a	2,1256 ± 0,011 _a	38,16 ± 25,22 _a
12,6	1,1606 ± 0,03 _a	19,02 ± 8,5 _a	2,2207 ± 0,005 _a	36,1 ± 17,37 _a	2,2228 ± 0,002 _a	24,66 ± 0,473 _a
25,2	1,5135 ± 0,02 _a	6,94 ± 4,4 _a	2,1349 ± 0,014 _a	18,22 ± 1,16 _a	2,1809 ± 0,043 _a	19,98 ± 0,64 _a
50,4	1,2584 ± 0,10 _a	17 ± 7,4 _a	2,1594 ± 5,64 _a	33,6 ± 5,5 _a	1,6788 ± 0,71 _a	29,54 ± 0,65 _a

_a : Moyenne de deux répliques indépendantes.

Les résultats obtenus montrent que l'activité émulsifiante maximale est enregistrée avec les rapports C/N de 6,3, 4,2 et 12,6. Les valeurs de E24 sont de 50,24%, 35,78% et 36,1 % respectivement. L'activité de surface du bioémulsifiant, quant à elle, est faible (un DDP d'environ 1 cm) et n'est pas influencée par les rapports C/N employés.

Ces résultats se concordent avec les travaux de Santa *et al* (2002) [93], Rashedi *et al* (2005) [99] et Chen *et al* (2005) [100] qui ont constaté que les faibles rapports C/N stimulent mieux la production de biosurfactants.

D'autre part Abdel-Mawgoud *et al* (2008) [96], ont travaillé sur l'optimisation de la production de la surfactine (un bioémulsifiant lipopeptidique) produit par *Bacillus subtilis* BS5. Une meilleure production a été obtenue en présence de 4,96 g/l de nitrate de sodium, ce qui donne un rapport de C/N compris 6,3 et 4,2.

Afin de confirmer les résultats de cet essai, nous l'avons répété une deuxième fois, avec trois rapports C/N 25,2 ; 12,6 et 6,3, en trois répliques pour chaque rapport. Le tableau 3.1 récapitule l'effet du rapport C/N des deux essais sur la production de bioémulsifiant dans le milieu MSM-glycérol.

Tableau 3.4: Test de reproductibilité des résultats des essais réalisés sur « l'influence du rapport C/N ».

Capacité émulsifiante							
C/N	Essai N°1	E24 (%)	Essai N°2	E24 (%)	Moy. Essais	E.S Essais	CV (%) Essais
25,2		19,04		7,28	13,16	8,31	63,16
12,6		48,38		36,88	42,63	8,13	19,07
6,3		55,55		33,81	44,68	15,37	34,4

Moy.: Moyenne arithmétique, *E.S*: Erreur standard issu des deux essais, *CV*: Coefficient de variation.

Les résultats montrent que les deux rapports 12,6 et 6,3 donnent une meilleure production de bioémulsifiant. Le coefficient de variation CV détermine l'écart ou la marge d'erreur.

Le CV est maximale pour un rapport de C/N = 25,2. En sciences biologiques, nous pourrions assister à un écart plus de 30 % avec des répliques opérés dans le même temps (répétabilité) ou à temps différent (reproductibilité).

3.1.1.4 L'effet de la salinité

La salinité est aussi l'un des paramètres les plus importants influençant la production de bioémulsifiant. La figure 3.4 montre son effet sur la croissance bactérienne et la capacité émulsifiante.

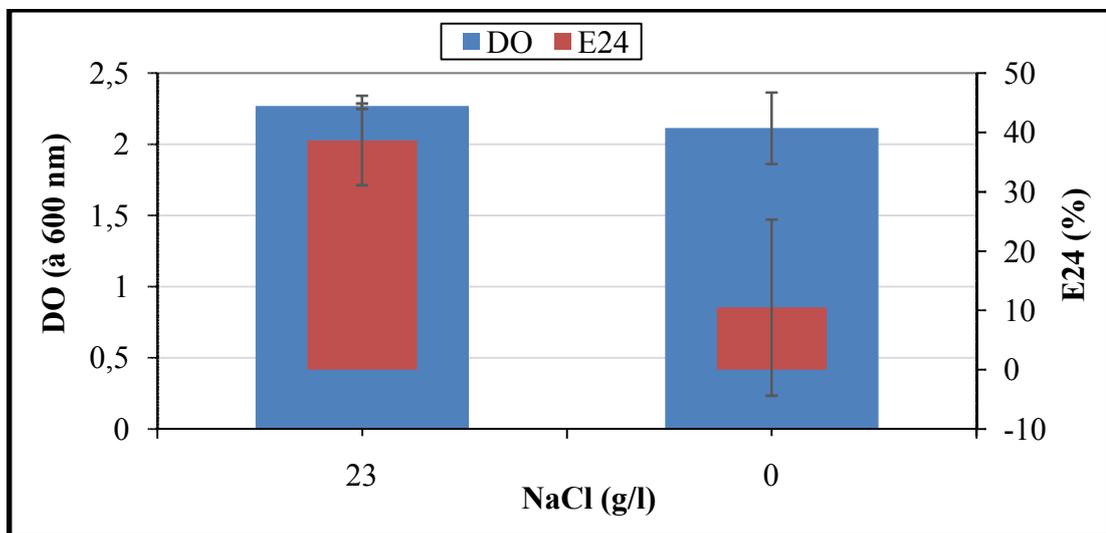


Figure 3.4: Influence de la salinité sur la croissance bactérienne (DO à 600 nm), et l'activité émulsifiante (E24 en %) dans le milieu de production MSM. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de deux répliques indépendantes.

Les résultats obtenus montrent que la salinité joue un rôle important dans la production de bioémulsifiant. L'absence de sel a un effet négatif sur la production. Une valeur de salinité de 23 g/l conduit à une activité d'émulsification (E24) de 40%. Cependant, la croissance microbienne n'est pas influencée par la salinité. La souche *M. hydrocarbonoclasticus* Sdk644 est une halotolérante, elle croît en présence comme en absence de NaCl pour un intervalle de salinité de 0 à 150 g/l NaCl (données non publiées). Par conséquent et d'après ces résultats, la présence de NaCl est indispensable pour la production de bioémulsifiant.

Selon Pepiet *al*(2004) [101], la souche *Halomonassp.* ANT3b était capable de produire un glycolipide dans un milieu de base contenant 24 g/l de NaCl et 2% (v/v) avec l'hexadécane comme source de carbone. En utilisant une souche marine de *Bacillus megaterium*, Thavasiet *al*(2008) [102], ont abouti à une production maximale de biosurfactant en présence de 30 g/l.

3.1.2 Influence de la nature du milieu de production

L'effet de la nature du milieu, qu'il soit riche ou pauvre sur la production du bioémulsifiant est présenté dans la figure 3.5.

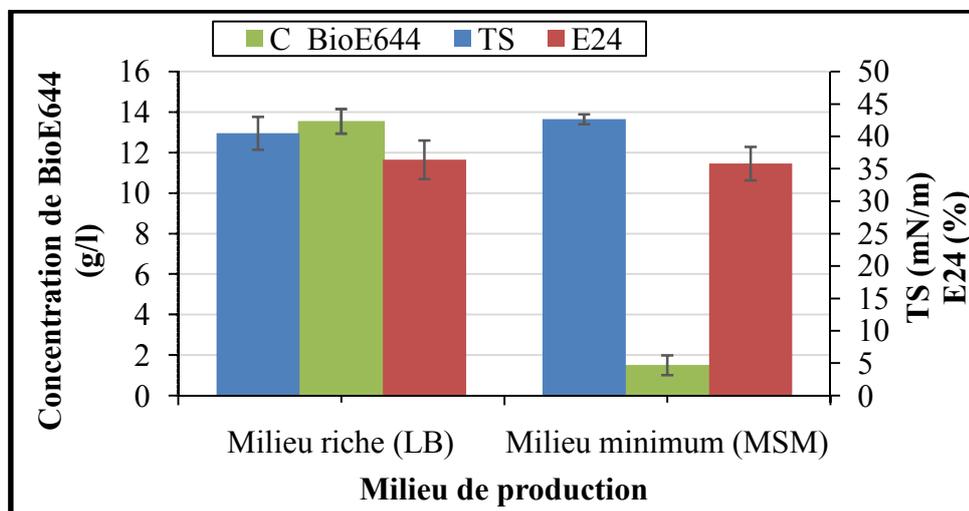


Figure 3.5 : Influence de la nature du milieu (riche LB ou pauvre MSM) sur l'activité de surface (TS en mN/m et DDP en cm) et l'activité émulsifiante (E24 en %). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de trois répliques indépendantes.

Les résultats obtenus ont révélé que l'activité émulsifiante (E24) dans le milieu LB et le milieu MSM est presque égale. Nous avons enregistré les valeurs de $36,40 \pm 2,97\%$ et $35,81 \pm 2,58\%$ respectivement. D'autre part, les valeurs de la tension de surface sont presque identiques dans les deux milieux préparés. Nous avons trouvés $42,663 \pm 0,77$ mN/m pour le milieu MSM et $40,506 \pm 2,53$ mN/m pour le milieu LB.

Cependant, la quantité de Bioémulsifiant BioE644 obtenue est très intéressante en utilisant un milieu LB. Les quantités obtenues en bioémulsifiant BioE644 sont $13,55 \pm 0,61$ et $1,52 \pm 0,49$ (g/l) respectivement pour les milieux LB et MSM. Donc d'après les résultats, le milieu LB est le meilleur pour une concentration optimale de bioémulsifiant produit.

3.1.3 Cinétique de production

Afin de déterminer la relation entre la croissance microbienne et la production de bioémulsifiant et d'optimiser le temps de production, des mesures de l'absorbance du trouble microbien à longueur d'onde de 600 nm, de la tension de surface et de l'activité émulsifiante ont été effectuées (figure 3.6).

Deux milieux ont été préparés ; LB et MSM, avec les conditions opératoires : une température d'incubation de 30°C, un pH du milieu de 7, une vitesse d'agitation est de 150 t/min et un temps d'incubation de 40 h. Sachant que le glycérol (2 % v/v) est la source de carbone inductrice dans les deux milieux. Le nitrate de sodium à 0,4 % (m/v) a été utilisé comme source d'azote dans le milieu MSM. Les résultats sont montrés dans la figure 3.6.

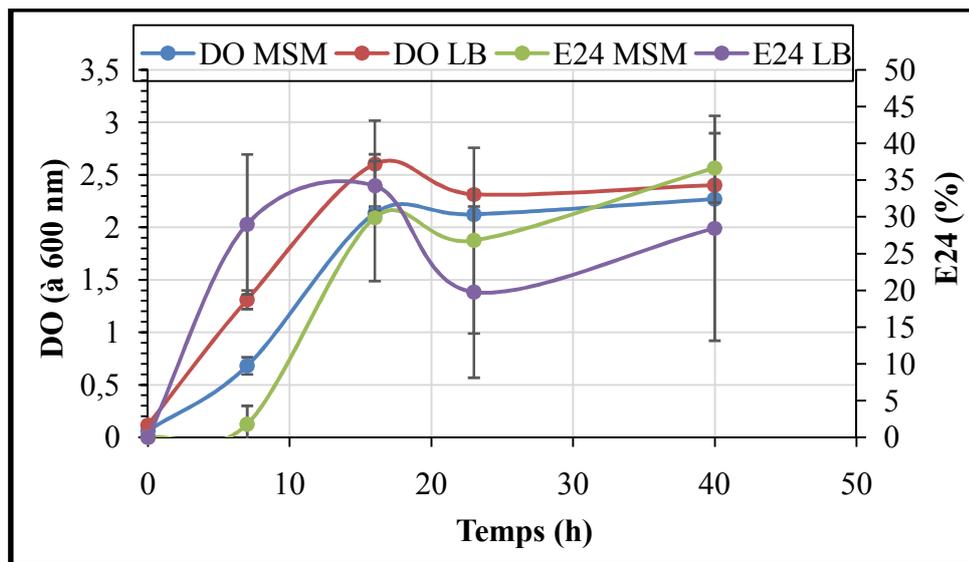


Figure 3.6 : Cinétique de croissance (DO à 600 nm) et de production du bioémulsifiant (E24 en %). Les barres d'erreur représentent l'erreur standard de deux répliques indépendantes.

Les résultats obtenus indiquent que la biomasse microbienne (DO) est maximale au bout d'un temps de 15 h dans les deux milieux (LB et MSM). D'autre part, nous remarquons que l'activité émulsifiante maximale est obtenue après 7 h d'incubation seulement dans le milieu LB (à la fin de la phase exponentielle de croissance), contrairement au milieu MSM où l'activité maximale est atteinte au bout de 40 h (durant la phase stationnaire). Donc d'après ces résultats, nous pouvons dire que nous sommes devant deux situations

différentes pour la synthèse de bioémulsifiant produit par la souche *M. hydrocarbonoclasticus* Sdk644. Avec le milieu riche LB, le bioémulsifiant est produit autant que métabolite primaire associé à la cinétique de croissance (*growth associated Kinetic*). A l'inverse, la synthèse du bioémulsifiant dans le milieu MSM ne se produit que lorsqu'il y a épuisement des éléments nutritifs (durant la phase stationnaire) (*Non-growth associated kinetic*). Dans ce cas, le bioémulsifiant est considéré comme métabolite secondaire.

Franzetti *et al* (2012) [21], a trouvé que l'activité émulsifiante maximale d'un bioémulsifiant produit par la souche *Variovorax paradoxus* 7bCT5 dans le milieu LB est observée à la fin de la phase exponentielle et reste constante après 48 h d'incubation (le bioémulsifiant produit est considéré donc comme métabolite primaire).

Sarubbo *et al* (2006) [103], a trouvé aussi que l'activité émulsifiante maximale d'un bioémulsifiant produit par la souche *Candida Glabrata* UCP 1002 dans un milieu minéral MM est observée durant la phase exponentielle (veut dire que le bioémulsifiant produit autant que métabolite primaire) avec l'huile de coton comme source de carbone d'une côté. De l'autre côté, l'activité émulsifiante maximale est observée durant la phase stationnaire (veut dire que le bioémulsifiant est synthétisé autant que métabolite secondaire) avec le n-hexadécane comme source de carbone.

3.2. EXTRACTION DU BIOÉMULSIFIANT

Pour extraire le bioémulsifiant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire d'éliminer la biomasse microbienne de ce milieu de culture (par centrifugation). La récupération des biotensioactifs dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules) [15]. L'extraction par solvants est la technique la plus utilisée. Différents solvants sont utilisés : chloroforme : méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc [15]. D'autres techniques reposant sur la précipitation du tensioactif sont ainsi employées.

Dans notre cas deux méthodes d'extraction ont été opérées :

- L'extraction par solvant ; en utilisant le mélange chloroforme : méthanol et l'acétate d'éthyle,
- La précipitation par l'éthanol à froid.

Le tableau 3.6 illustre l'efficacité des solvants utilisés pour l'extraction de bioémulsifiant.

Tableau 3.6 : Efficacité des différents solvants utilisés pour l'extraction du Bioémulsifiant.

Solvants	Concentration de BioE644 (g/l)		Capacité émulsifiante (E24 en %)	
	LB	MSM	LB	MSM
Cold éthanol	2,08±0.13 _a	1,15±0.37 _a	65 _b	NR
CHCl₃/CH₃OH	4,24±0,75 _a	0,554±0.63 _a	60 _b	30 _b
Acétate d'éthyle	0,38±0.68 _a	2,255 _b	57 _a	0 _a

NR : non réalisé. ^a : moyenne de deux répliques indépendante. ^b : un seul réplique.

D'après les résultats obtenus, la production de bioémulsifiant est meilleure dans le milieu LB où nous avons enregistré une concentration en bioémulsifiant plus élevée par rapport au milieu MSM. La concentration maximale est obtenue en utilisant un milieu LB extrait avec un mélange de chloroforme/méthanol. Cependant, la concentration n'aura aucun intérêt si ne s'associer pas avec une bonne émulsification. Donc, d'après tous ces résultats c'est le milieu LB qui donne le meilleur pouvoir émulsifiant.

3.3. CARACTERISATION DU BIOÉMULSIFIANT

3.3.1 Propriétés fonctionnelles de bioémulsifiant

3.3.1.1 Stabilité du bioémulsifiant

L'effet de la température, du pH et du temps d'incubation sur la stabilité de bioémulsifiant est ainsi étudié.

➤ Stabilité thermique

L'effet de la température sur la stabilité des bioémulsifiants est illustré sur les figures 3.7, 3.8 et 3.9.

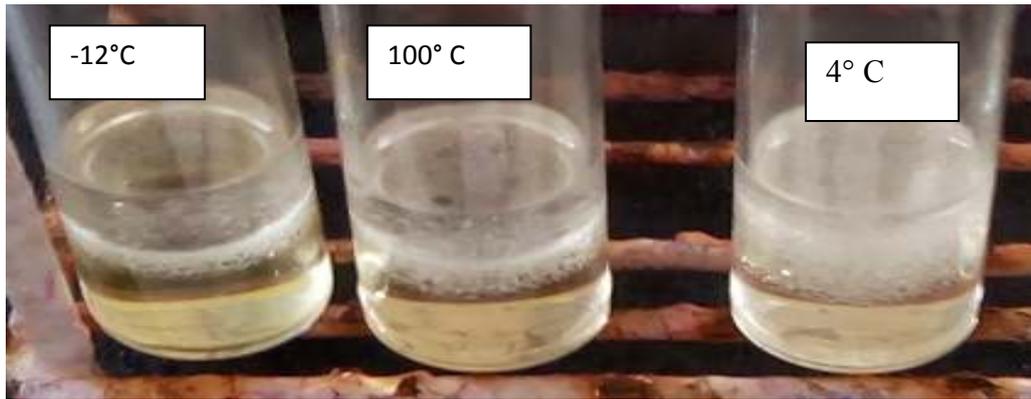


Figure 3.7 : Prise photo montrant l'effet de la température sur l'activité émulsifiante dans le milieu MSM-glycérol.

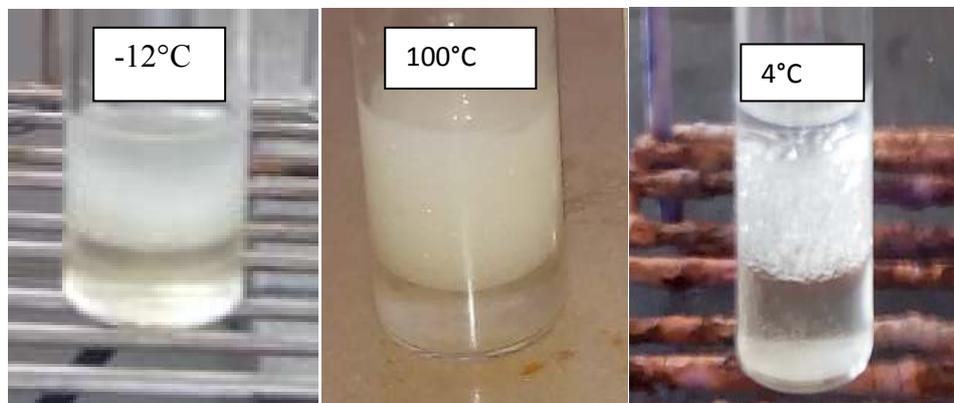


Figure 3.8: Prise photo montrant l'effet de la température sur l'activité émulsifiante dans le milieu LB-glycérol.

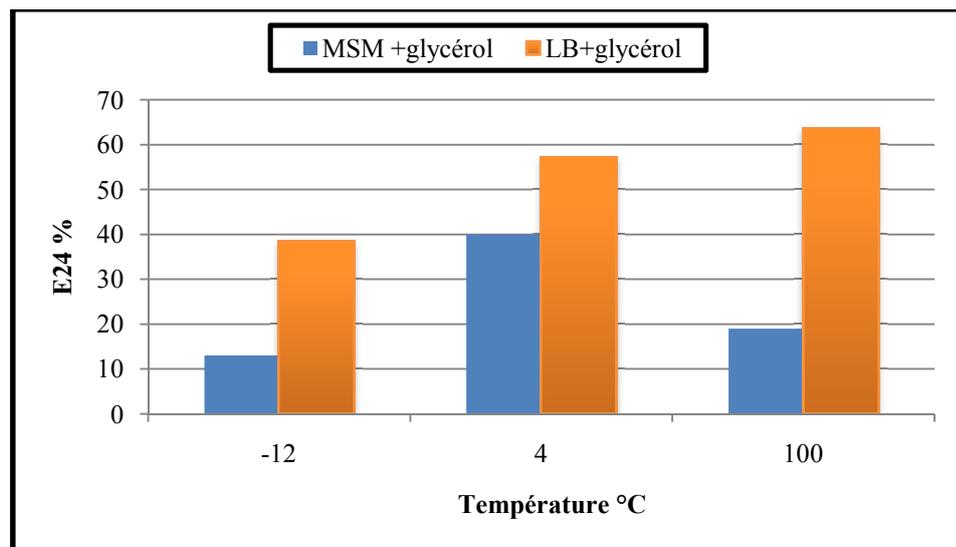


Figure 3.9 : Stabilité thermique de bioémulsifiant avec trois températures différentes (à 4, -12 et 100 °C) dans le milieu MSM-glycérol et LB –glycérol.

Les résultats obtenus indiquent que le bioémulsifiant est très stable dans la gamme de température de 4 à 100 °C pour le surnageant du milieu LB. Par exemple, les valeurs de E24 sont 57,1 % et 63,6 % à des températures 4°C et 100 °C respectivement. Toutefois, la congélation à -12°C pendant une nuit conduit à une perte de 39,6% de l'activité émulsifiante du bioémulsifiant (38,4 %).

Cependant, le milieu MSM produit un bioémulsifiant qui n'est pas stable pour des températures très élevées ou très basses. A des températures de - 12 et 100 °C, les valeurs de (E24) sont 13 % et 19 % respectivement.

Saimmai *et al* (2013)[104] a indiqué une bonne stabilité thermique pour un biosurfactant produit par une souche marine *Inquilinus limosus* KB3 dans une large gamme de température allant de 4 à 120 °C.

Eddouaouda (2012)[20], a trouvé que le biosurfactant produit par une souche *Staphylococcus* sp. 1E est stable durant l'augmentation de la température de 4 jusqu'à 55°C. Pour des températures plus élevées (70°C, 100°C) le biosurfactant est instable thermiquement.

➤ Stabilité acido-basique

L'importance des caractéristiques de la plupart des organismes est leur forte dépendance vis-à-vis du pH pour la croissance cellulaire et la production de métabolites secondaires.

L'indice d'émulsification (E24) a été mesuré pour différentes valeurs de pH : 2, 4, 7, 9 et 12. Les figures 3.10 et 3.11, illustrent l'influence de pH sur la stabilité de bioémulsifiant dans les deux milieux (LB-glycérol et MSM-glycérol).

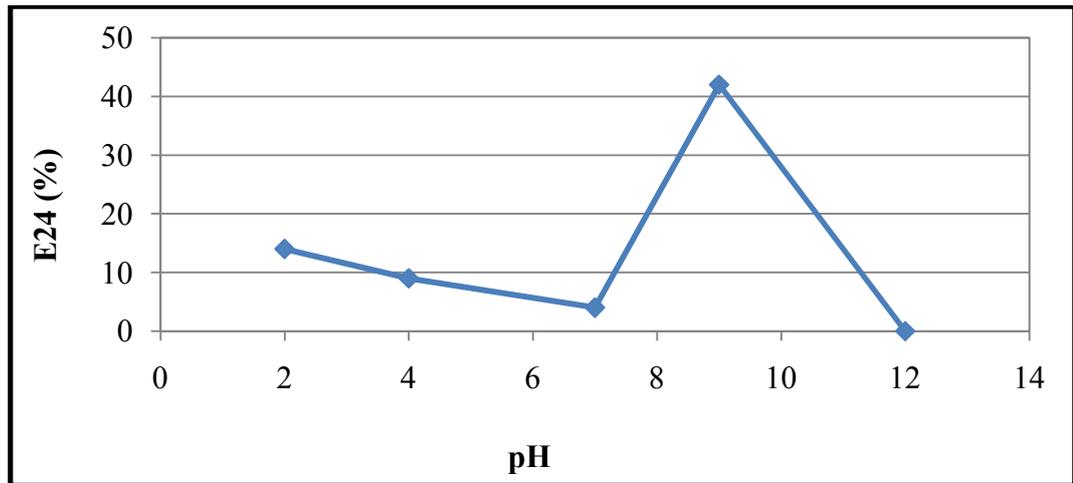


Figure3.10: Stabilité du bioémulsifiant (surfactant MSM-glycérol) à différents pH.

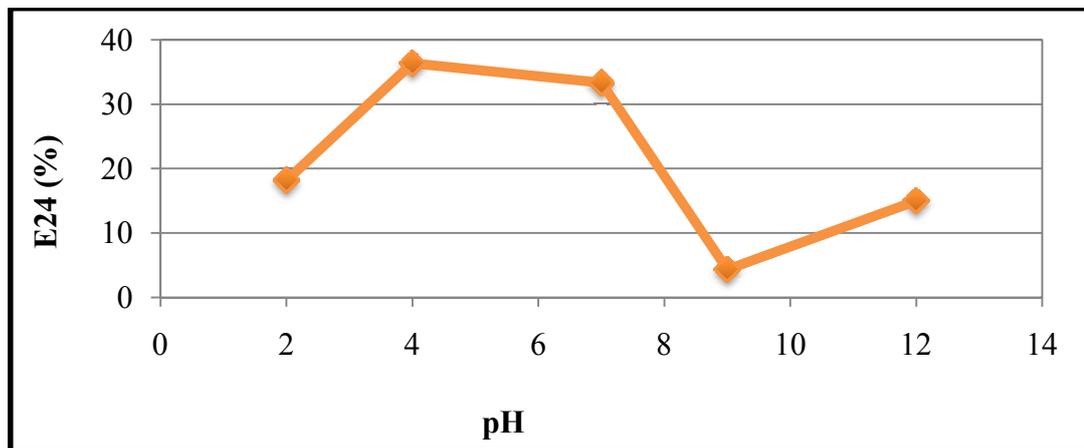


Figure3.11: Stabilité du bioémulsifiant (surfactant LB-glycérol) à différents pH.

Pour le milieu MSM-glycérol, les résultats de l'effet du pH sur la stabilité de bioémulsifiant révèlent que le bioémulsifiant (bioE644) est stable dans une gamme étroite de pH. Des milieux acides sont défavorables pour l'application de BioE644. Par conséquent le pH9 est la valeur optimale pour une bonne stabilité de bioE644.

D'autre part, les résultats obtenus, en présence de milieu LB, montrent que le bioémulsifiant (BioE644) est plus stable dans un intervalle de pH allant de 4 à 8. En dehors de cette gamme, il devient moins stable. Haddad *et al*(2009) [105], ont trouvé qu'un pH acide (pH = 4) influe négativement sur l'activité de biosurfactant.

En revanche, les travaux de Ferradji (2014) [106], indiquent que le biosurfactants Bio-AB1 est stable à des pH compris entre 2 à 11. De même, Eddouaouda (2012) [20], a trouvé que

le biosurfactant produit par la souche 1E est très stable dans toute la gamme de pH allant de 2 à 12.

Biao *et al*(2012) [107], ont remarqué que le biosurfactant produit par la souche *Nocardiopsis*. B4 est stable en milieu basique (8 à 12), mais il est moins stable en milieu acide ($\text{pH} < 7$). Des résultats similaires ont été signalés par Bezza et Chirwa (2015) [85], ils ont constaté qu'un lipopeptide produit par *Bacillus subtilis* CN2 est stable dans une gamme de pH de 5 à 13. À des pH inférieurs à 5, la stabilité du biosurfactant est considérablement réduite suite à la précipitation du produit.

➤ Durabilité de l'émulsion

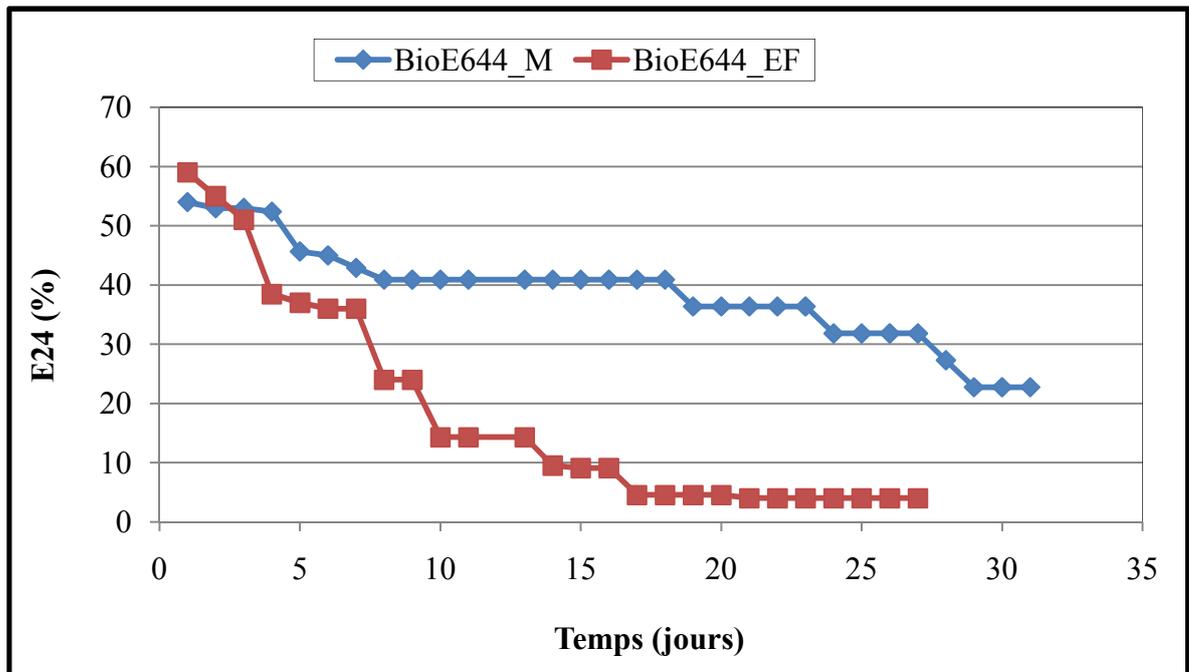


Figure 3.12 : efficacité du bioémulsifiant BioE644 extrait par le mélange chloroforme : méthanol ou l'éthanol à froid dans la stabilisation d'émulsion E/H en fonction du temps.

Les résultats obtenus montrent que l'activité émulsifiante du BioE644 extrait par le mélange chloroforme : méthanol (une concentration de 0,6 % m/v) est gardée maximale pendant 5 jours (E24 de 52 % dans le 5^{ème} jour). Dans les trois jours qui se suivent, elle diminue à 41 % et reste constante jusqu'au 18^{ème} jour. A partir du 19^{ème} jour, le E24 chute légèrement (36 %) et garde sa valeur après 5 jours d'incubation à température

ambiante. L'émulsion E/H perd sa stabilité par la suite jusqu'au 31^{ème} jour où elle atteint une valeur de 22,72%.

Cependant, pour le BioE644 extrait par l'éthanol à froid, nous avons obtenu une valeur de E24 de 59%, mais l'émulsion diminue rapidement en fonction du temps (E24 de 14 % après 10 jours et 4 % après 27 jours).

Les bioémulsifiants sont connus pour leur pouvoir stabilisateur d'émulsions en fonction du temps. Bien que le bioémulsifiant BioE644 produit par la souche *M. hydrocarbonoclasticus* Sdk644 est stable pour une période de 18 jours, d'autres émulsifiantes microbiennes cités dans la littérature ont une durabilité de l'émulsion supérieure. Le cas du bioémulsifiant produit par *V. paradoxus* est stable pendant 12 mois (E24 de 59 %) [21]. Luna-Velasco *et al*(2007)[108] a trouvé que le bioémulsifiant synthétisé par la *Penicillium* sp est stable durant 90 jours d'incubation à température ambiante (E24 de 66 %).

Selon Monteiro *et al*(2010) [52], Willumsen 1997[63] et Kaplan *et al*(1982) [64], les bioémulsifiants sont capables de stabiliser les émulsions en augmentant leur cinétique de stabilité et cette propriété a augmenté leur utilité dans les industries des produits cosmétiques, alimentaires, pharmaceutiques et pétroliers.

3.3.1.2 Pouvoir émulsifiant

Les bioémulsifiants s'appliquent dans différents domaines industriels et environnementaux. Leur pouvoir émulsifiant vis-à-vis différents substrats hydrophobes détermine les potentialités spécifiques pour une telle ou telle application.

Le tableau 3.7 présente les données relatives au pouvoir émulsifiant de trois bioémulsifiants produits par la souche *M. hydrocarbonoclasticus* Sdk644 ainsi que le type d'émulsion produite.

Tableau 3.7 : Pouvoir émulsifiant des surnageants MSM-glycérol ; LB-glycérol et MSM-HF vis-à-vis différents substrats hydrophobes et type d'émulsion formée.

Substrats hydrophobes	Surnageant MSM-HF			Surnageant MSM-glycérol			Surnageant LB-glycérol		
	E24 (%)		Type d'émulsion	E24 (%)		Type d'émulsion	E24 (%)		Type d'émulsion
	Après 10min	Après 24 h		Après 10min	Après 24 h		Après 10min	Après 24 h	
huile d'avoine	50	0	H/E et E/H	30,33	0	H/E et E/H	10	0	H/E
huile de pin	45,45	0	H/E et E/H	45	0	H/E et E/H	57,14	0	E/H
huile de moteur	100	78,26	H/E	90,82	80	H/E	61,9	40	E/H
huile d'olive	0	0	-	0	0	-	30	19,04	E/H
pétrole 1	0	0	-	0	0	-	55	35	H/E
pétrole 2	47	13,63	E/H	43	30	E/H	0	0	-
huile de table	0	0	-	0	0	-	50	4,76	E/H
Toluène	50	45,45	E/H	62	55	E/H	60	47,61	E/H
Dichlorométhane	55	52,38	E/H	69	68,57	H/E	52,17	52,17	H/E
Hexane	42,85	42	E/H	34	33,33	E/H	0	0	-

D'après les résultats obtenus, nous remarquons que la meilleure activité émulsifiante, pour les trois milieux, est obtenue avec l'huile de moteur. L'émulsion formée dans ce cas est de type huile dans l'eau avec le surnageant du milieu MSM et eau dans l'huile pour le surnageant du milieu LB, indépendamment de la source de carbone.

Egalement, une émulsification intéressante a été obtenue en présence de dichlorométhane (E24 > 52%) suivi par le toluène (> 45%) pour les trois surnageants. L'émulsion est de type H/E avec le dichlorométhane quand le glycérol est la source de carbone dans les deux milieux MSM et LB. Avec le toluène, l'émulsion produite est de type E/H indépendamment du milieu et de la source de carbone. L'hexane est ainsi émulsionné moyennement avec les surnageants du milieu MSM (E/H), alors que le surnageant du milieu LB forme une émulsion H/E moyennement épaisse avec le pétrole 1. Les huiles végétales sont les moins émulsionnées avec les bioémulsifiants bruts de la souche Sdk644. Ses résultats suggèrent que le bioémulsifiant de la souche *M. hydrocarbonoclasticus* Sdk644 pourrait être employé prédominamment dans le domaine environnemental ; dans les opérations de nettoyage des cuves contenant des hydrocarbures et des solvants organiques, la récupération assistée du pétrole et la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures.

Uad *et al* (2010) [109], a observé une bonne émulsification avec le Xylène (E24 de 76 %) et le toluène (E24 de 74 %) suivi par le gasoil (44 %). Des pétroles légers et lourds n'ont pas été émulsionnés par ce bioémulsifiant polysaccharidique synthétisé par une souche de *Marinobacter* spp, isolé d'un sédiment prélevé à une profondeur de 4000 m.

Franzetti *et al*(2012) [21], a signalé une bonne émulsification vis-à-vis le kérosène, le gasoil, l'huile de moteur et huile de soja avec le surnageant de la souche *V. paradoxus* 7bCT5. Zheng *et al*(2011) [110], a isolé deux bioémulsifiants produites par deux souches thermophiles *Geobacillus pallidus* XS2 et XS3 efficaces dans l'émulsification de l'hexadécane (E24 de 61 % et 55 % respectivement). Luna-velasco *et al*(2007) [108], ont constaté qu'une bonne émulsion (eau dans l'huile) est produite avec le kérosène, le gasoil et le xylène. Toutefois, le dichlorométhane a été faiblement émulsionné.

Eddouaouda *et al*(2012)[20], ont obtenu des résultats similaires avec l'huile de moteur (E24 de 78,57 %) et une émulsification modérée avec le gasoil, l'huile d'olive et l'huile végétale (42,85% ; 42,48 % et 51,14 % respectivement) en utilisant un biosurfactant produit par une souche *Staphylococcus* sp. 1E cultivée sur un milieu LB additionné de l'huile d'olive.

3.3.2 Propriétés structurales

3.3.2.1 Dosage biochimique

L'analyse biochimique du bioémulsifiant produit la souche *M. hydrocarbonoclasticus* Sdk644 avec le milieu LB-glycérol a confirmé la présence des lipides et des hydrates de carbone. Le taux de glucides, déterminé à partir de la courbe d'étalonnage (figure 3.13) est de $30,93 \pm 1,75$ (mg/l). Le taux de lipides est de $28,99 \pm 6,23$ (% , m/m). Une concentration proche des sucres a été trouvée avec le bioémulsifiant produit dans le milieu MSM amendé de l'huile de friture (32,4 mg/l). Le dosage des lipides n'a pas été fait pour ce dernier.

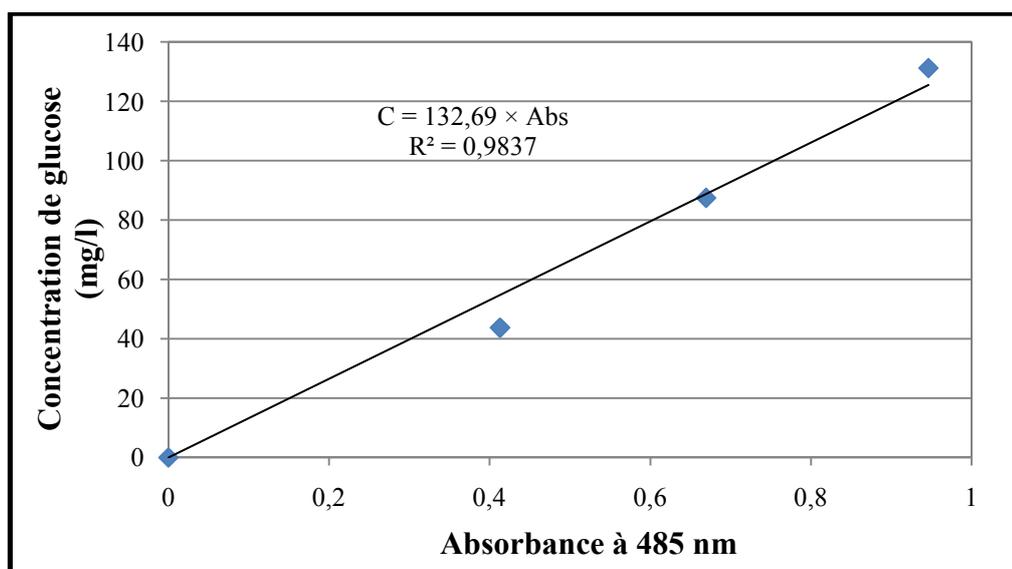


Figure 3.13 : Courbe d'étalonnage des glucides.

A1-Mallah *et al* (1990) [111], a trouvé un taux similaire des hydrates de carbone avec un bioémulsifiant sécrété par la souche *M. hydrocarbonoclasticus* SP17 cultivé sur eicosène (n-C20) et lactate comme sources de carbone (37 et 23,46 mg/l respectivement). La concentration des lipides totaux était respectivement 15,58 et 1,76 mg/l. Une faible concentration en protéines a été signalée par l'auteur avec les deux sources de carbone ; eicosène et lactate (0,45 mg/l chacune). Singh *et al*(2011) [112], a trouvé un taux plus élevé en hydrates de carbone (343,14 mg/l) pour un exopolysaccharide produit par *Bacillus licheniformis*. Le bioémulsifiant produit par *V. paradoxus* 7bCT5 dans le milieu LB est composé de 94 % de sucres, 4 % de lipides et 1 % de protéines [21].

3.3.2.2 Chromatographie sur couche mince

L'analyse CCM du bioémulsifiant brut produit dans le milieu LB-glycérol et extrait par chloroforme : méthanol avec les différents solvants de développement et d'agents de visualisation à révéler la présence des sucres (figure 3.14), l'absence des acides aminés et des lipides.

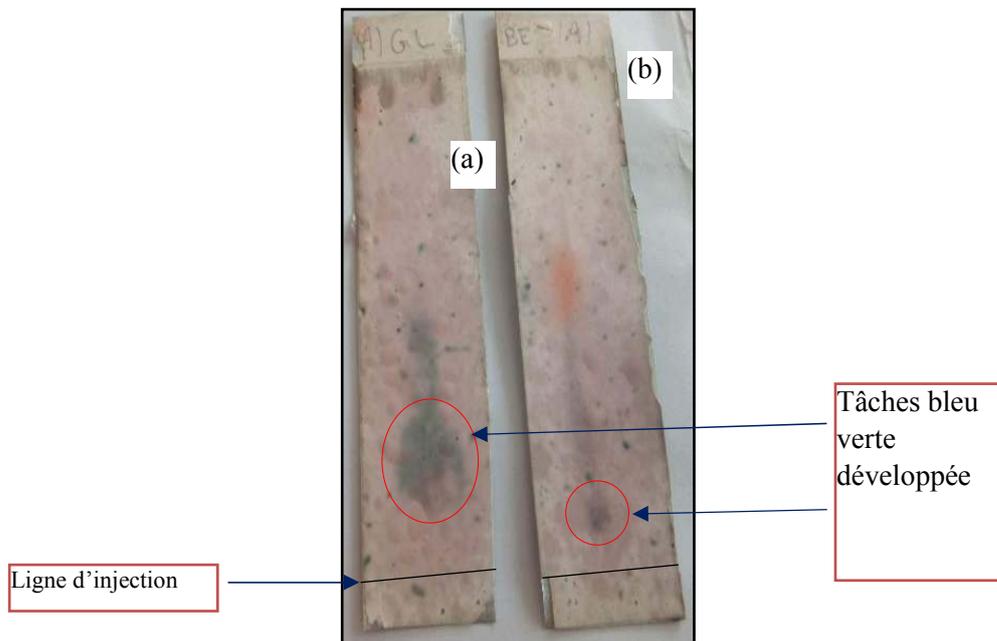


Figure 3.14 : Révélation des sucres avec (a) la solution de glucose et (b) avec le bioémulsifiant.

La présence des sucres a été confirmée dans le bioémulsifiant en employant une autre plaque tachée avec une solution de glucose. Après révélation, nous avons obtenu la même coloration (bleu vert) pour les deux produits. Ainsi, nous avons reproduire la révélation des sucres avec des solutions aqueuses de bioémulsifiant, de glucose et un témoin (avec l'eau distillée). Après ajout du réactif anthrone aux solutions, une coloration bleu verte plus intense a été développée dans la solution de glucose qu'avec la solution de BioE644. Aucune réaction n'a été développée avec le témoin (figure 3.15).



Figure 3.15: révélation des sucres avec les solutions de glucose et de bioémulsifiant.

L'absence des acides aminés a été aussi confirmée en milieu liquide où aucune coloration rouge a été développée avec la solution de bioémulsifiant. Toutefois, une coloration rouge a persisté avec une solution de lactosérum (contrôle positif) (figure 3.16).

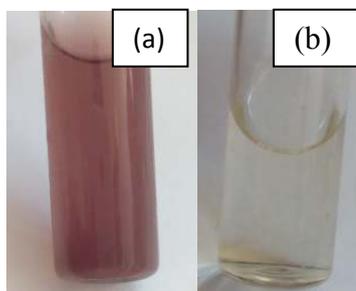


Figure 3.16 : Révélation des acides aminés en milieu liquide. (a) solution de lactosérum, (b) solution de bioémulsifiant.

Cependant, la présence des lipides a été bien visualisée en préparant une solution de biosurfactant traitée avec le réactif de bleu de bromothymol (figure 3.17), contrairement à aucune coloration n'a été développée.

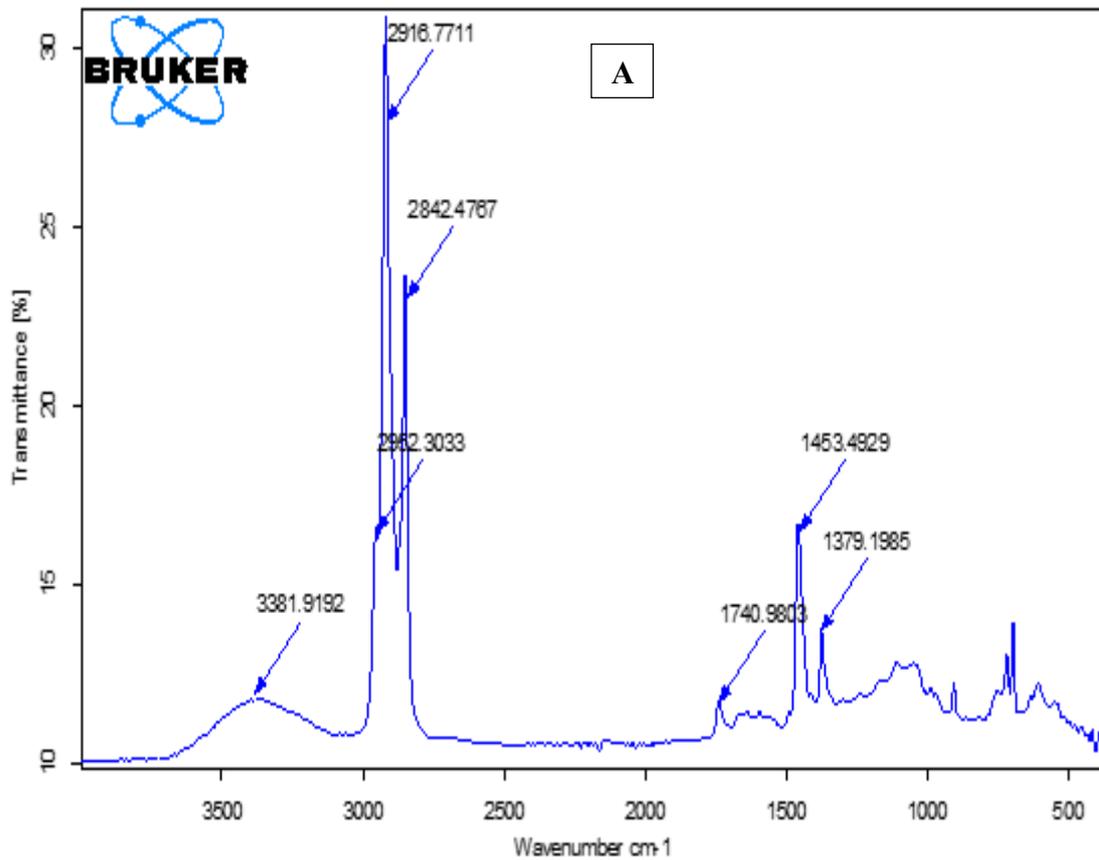


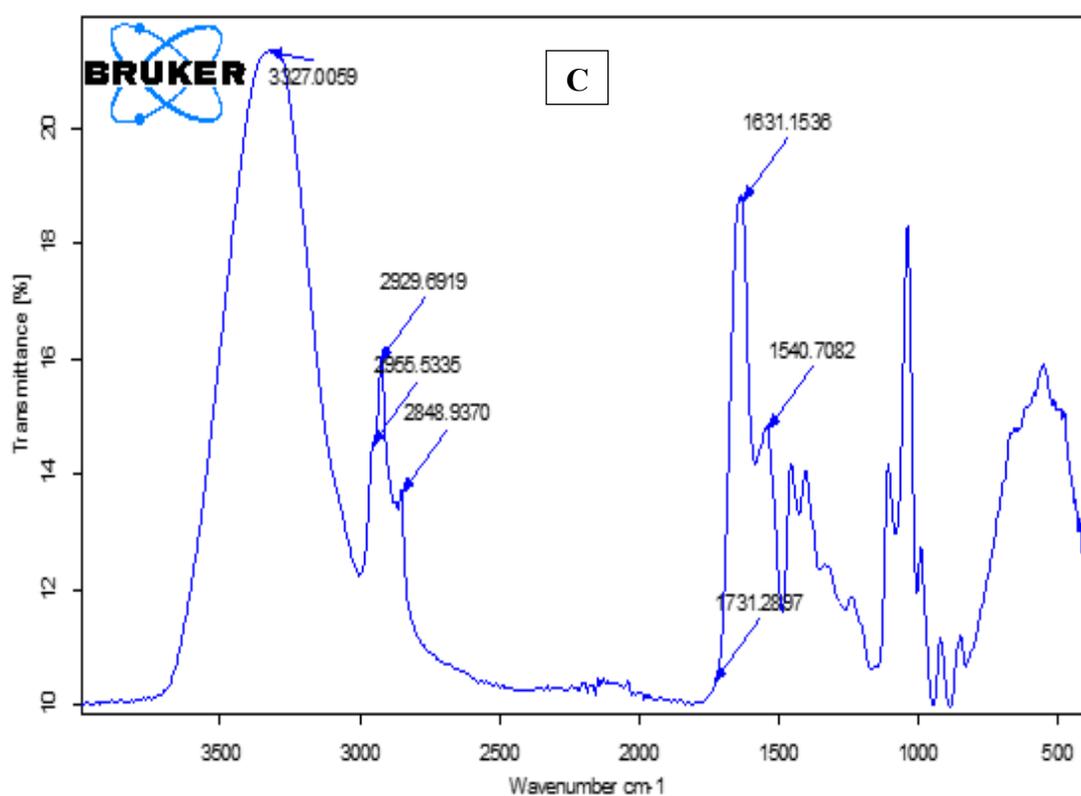
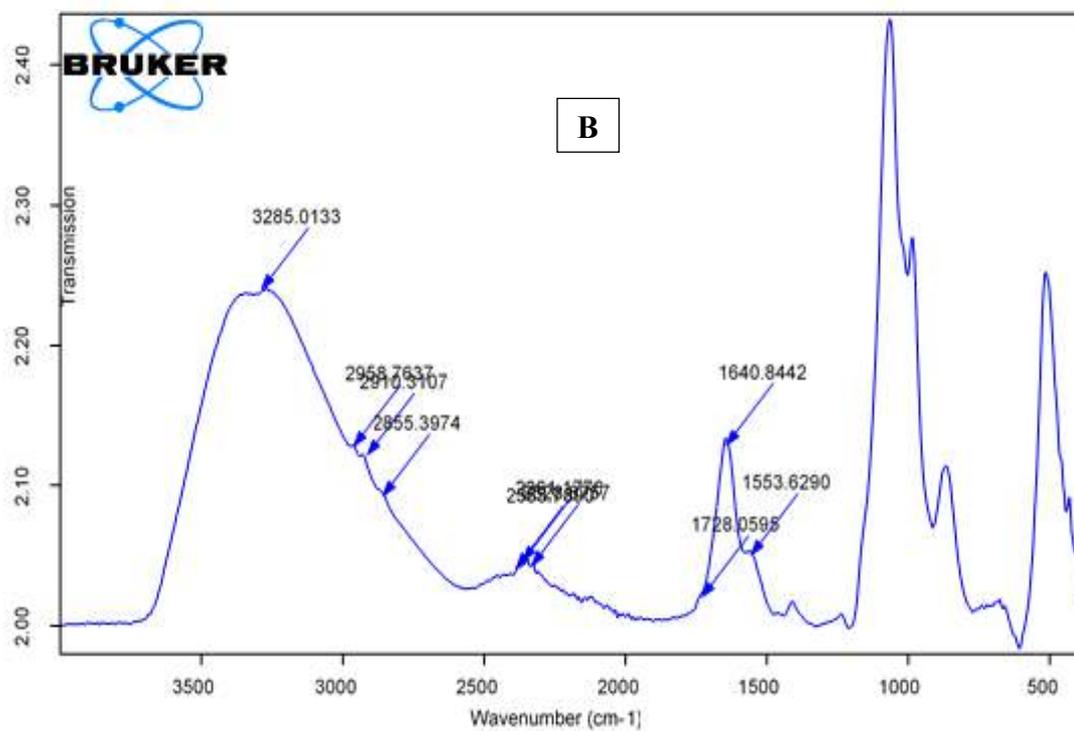
Figure 3.17 : Révélation des lipides avec une solution aqueuse de bioémulsifiant.

Bien que nous ayons détecté une tache bleu verte mince avec le réactif anthrone (un R_f très faible), l'absence des acides aminés et surtout les lipides indiquent probablement que notre produit est formé d'une structure complexe de polysaccharides et lipides. La présence des sucres et des lipides et l'absence des structures protéiques ont été confirmées en milieu liquide. Bonilla et al, (2005) [10], en utilisant une batterie d'agents révélateurs, a indiqué l'absence des composés de faible poids moléculaires comme les petits peptides, lipopeptides, Rhamnolipids et d'autres glycolipides et les phospholipides.

3.3.2.3 Analyse par infrarouge (IRRTA)

La IRRTA est l'analyse la plus utile pour identifier les types de liaisons chimiques (groupes fonctionnels) présents dans la fraction biologiquement active d'un bioémulsifiant inconnu et détermine ainsi sa nature chimique.





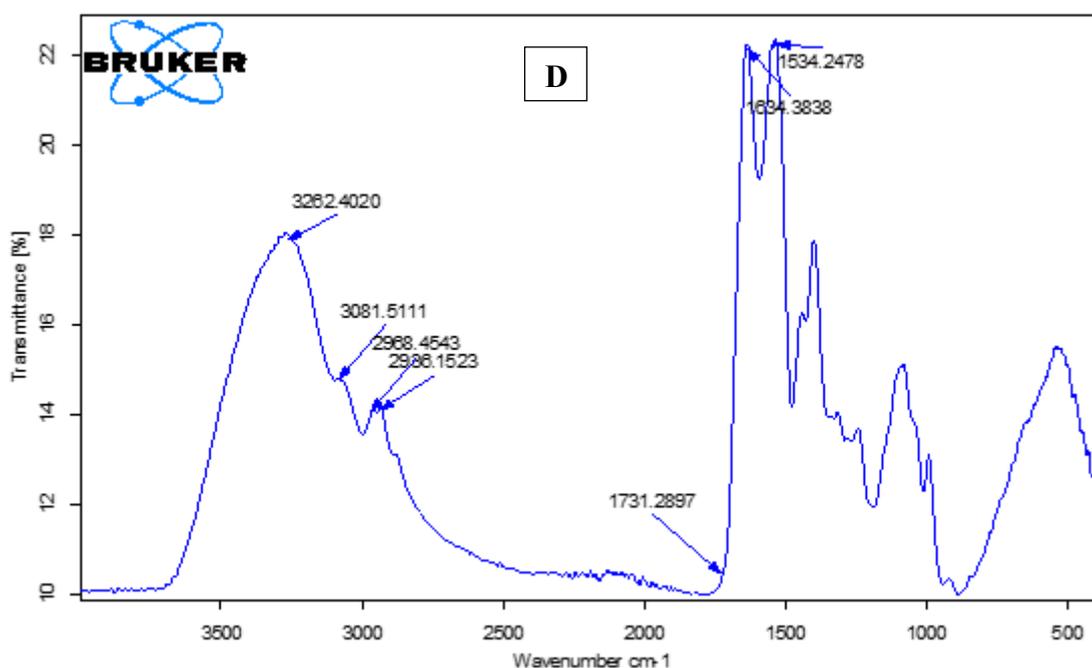


Figure 3.18: Analyse IRRTA du bioémulsifiant BioE644. **A** produit dans le MSM-glycérol, **B** produit dans le MSM-HF, **C** produit dans le LB-glycérol extrait par le mélange et **D** produit dans le LB-glycérol extrait par l'éthanol.

Les spectres affichées pour le bioémulsifiant BioE644 produit par *Marinobacterhydrocarbonoclasticus* Sdk644 dans les deux milieux MSM et LB avec le glycérol et l'huile de friture usagée comme sources de carbone montrent certaine ressemblance dans la nature des groupements fonctionnels identifiés.

En effet, les bandes larges situées à 3299 et 3326 cm^{-1} sont attribués aux vibrations d'élongation des groupements OH des hydrates de carbone [79,113], et des acides carboxyliques.

Ainsi, des pics caractéristiques des acides gras ont été identifiés. Ceux trouvés dans la région 2900 cm^{-1} confirment la présence des groupements alkyles (les groupes CH_2 et CH_3) des chaînes aliphatiques insaturées [79,113,114], le pic localisé dans la région de 1740 et 1728 cm^{-1} est attribué à la vibration d'élongation du groupement carbonyle ($\text{C}=\text{O}$) et celui trouvé autour de 1640 cm^{-1} est alloué aux vibrations de l'ion carboxylate (COO^-) dans la moitié uronique (groupement carbonyle et fonction d'acide carboxylique à la fois) [79, 115].

Les pics situés autour de 2340 cm^{-1} sont dus aux vibrations d'élongation des O-H chélatés dans les sucres.

La bande apparue dans la région 1540 cm^{-1} est due aux vibrations de déformation des liaisons CH [116, 117].

La région en dessous de 1500 cm^{-1} est la région appelée des « empreintes », spécifique à des composés de structures chimiques identiques.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Depuis la révolution industrielle, au dernier siècle, l'homme n'a pas cessé de proposer de nouvelles sources d'énergies. La découverte du pétrole a donné un essor considérable aux industries. Depuis, les réserves naturelles du pétrole ont été utilisées sans limite et le risque d'être épuisées à court et à moyen terme est accru. Sachant que ces ressources ne sont pas renouvelables, il est indispensable de songer à une meilleure exploitation des gisements et à une récupération maximale du pétrole, aussi bien des puits que des containers. De là, il est clairement nécessaire d'utiliser des substances appelées « les surfactants chimiques », qui permettent une récupération presque totale de pétrole [1].

La production mondiale actuelle de surfactants chimiques se chiffre à plus de 3 millions de tonnes par année [2]. La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque environnemental, car ils sont généralement toxiques et non biodégradables [3,4, 5, 6]. C'est pourquoi, depuis plusieurs années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques s'intéressent de plus en plus à des surfactants produits par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou « biosurfactants ». Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et qui sont également efficaces à des températures, des pH et des salinités extrêmes [2]. Cependant, leurs coûts de production demeurent encore assez élevés et freinent leur utilisation [7]. Les substrats de croissance pour les microorganismes producteurs de biosurfactants sont peu coûteux, mais le faible taux de production et les procédures de purification font que leurs coûts peuvent être parfois supérieurs à ceux des tensioactifs chimiques [8,9].

Les biosurfactants se subdivisent en deux groupes majeurs : les biosurfactants, de faibles poids moléculaires et les composés de haut poids moléculaire appelés les bioémulsifiants. La structure chimique de ces derniers renferme des polysaccharides, des protéines, des lipopolysaccharides, lipoprotéines ou un mélange de ces polymères.

Contrairement aux biosurfactants, les bioémulsifiants ne provoquent pas une réduction importante des tensions de surface et interfaciales mais ils conduisent à la formation d'émulsions stables. Les applications potentielles des bioémulsifiants incluent la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, la récupération assistée du pétrole (*enhanced oil recovery EOR*), la formation d'émulsions stables (huile dans l'eau) en industrie alimentaire et dans les industries cosmétiques [10].

De l'autre côté, la croissance microbienne et l'accumulation des produits métaboliques à l'instar des bioémulsifiants sont fortement influencés par la composition du milieu (la source de carbone, source d'azote et les sels inorganiques). D'autres facteurs environnementaux (le pH et la température) affectant également la production de bioémulsifiants [11]. Par conséquent, il est difficile de rechercher les principaux facteurs et les optimiser pour les processus biotechnologiques du fait de l'implication de plusieurs paramètres [12].

L'objectif principal du présent travail est la caractérisation et l'étude des propriétés tensioactives d'un bioémulsifiant produit par une souche marine hydrocarbonolclaste isolée localement en utilisant des substrats solubles assimilables.

Le mémoire est structuré comme suit :

Un premier chapitre de bibliographie faisant point sur les biosurfactants/bioémulsifiants, leur classification et les microorganismes producteurs, les paramètres influençant leur production, leurs propriétés et les domaines dont ils ont potentiellement appliqués.

Un deuxième chapitre est réservé à la présentation de la méthodologie adoptée pour la réalisation de ce travail.

Un troisième chapitre est consacré à la présentation des résultats obtenus ainsi que les interprétations et les discussions par rapport aux travaux de la littérature.

Enfin, une conclusion générale mettra en valeurs l'ensemble des résultats obtenus, des perspectives s'en ressortissent.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Khemili S., « Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites ». Thèse de Magister en Biologie. Université M'HAMED BOUGARA Boumerdes. Algérie.(2008).
- 2) Banat I., « Les biosurfactants plus que jamais sollicités ». *Biofutur ; mensuel Européen de biotechnologie*, 198(2000) :40-46.
- 3) Parra J.L., Guinea J., Manresa M. A., Robert M., Mercadé M.E., Comelles Fet Bosch M.P., « Chemical characterization and physicochemical behaviour of biosurfactants ». *Journal of American Oil Chemistry Society* 66(1989):141–145.
- 4) Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R., « Microbial production of biosurfactants, Resources, Conservation and Recycling », (1996):18:41-57.
- 5) Page C.A, Bonner J.S, Kanga S.A., Mills M.A. et Auteurieth R.L., « Biosurfactant solubilization of polycyclic-aromatic hydrocarbons ». *Environmental Engineering Science*, 16 no. 6 (1999):465-474.
- 6) Vipulanandan C. et Ren X., « Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant », *Journal of Environmental Engineering* 126 no. 7(2000): 629-634.
- 7) Bognolo G., « Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons », *Colloids and Surfaces A: Physico-Chemical and Engineering Aspects*, 152(1999): 41-52.
- 8) Van Dyke M.I., Couture P., Brauer M., Lee H et Trevors J.T., « *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil ». *Canadian Journal of Microbiology*. 39(1993):1071-1078.
- 9) Fiechter A., « Biosurfactants: moving towards industrial application » *Tibtech* 10,(1992):3-12.
- 10) Bonilla M., Olivaro C., Corona M., Vazquez A et Soubes M., « Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2 ». *Journal of Applied Microbiology* 98,(2005): 456–463.
- 11) Rodriguez L., Teixeira J.A., Van Der Mei H.C et Oliveira R., « Isolation and

partialcharacterisation of a biosurfactant produced by *Streptococcus thermophiles A*». Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 53, (2006):105-112.

12)Gandhimathi R., SeghalKiran,HemaT.A., SelvinJ., RavijiR., et ShanmughapriyaS., « Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsisalba* MSA10 ».Bioprocess Biosystem Engineering 32no. 6 (2009):825-35.

13)West C.C.,et Harwell J.H., « Surfactants and subsurface remediation », *Environnemental Science and Technology*36 no. 12 (1992): 2324 - 2330.

14) Banat M., Makkar R.S et Cameotra S.S.,« Potential commercial applications of microbial surfactants ». *Journal of Applied Microbiology*53, (2000) : 495-508.

15)Desai J. D et Banat I.M., « Microbial production of surfactants and their commercial potential », *Microbiology and Molecular Biology Reviews*61 no.1 (1997): 47-64.

16)Cameotra S.S. etMakkar L.R., « Synthesis of biosurfactants under extreme conditions». *Journal of Applied Microbiology*50, (1998): 520-529.

17)Mulligan C.N., JeuneR.N.,et Gibbs B.F., « ContaminatedSoilRemediationOfficer: A Review». *La géologie de l'ingénieur* 60,(2001) : 371-380.

18)GabetS., « Remobilization of PolycyclicAromaticHydrocarbons (PAHs) present in contaminatedsoilsusing a surfactant of biologicalorigin ». Thèse de doctorat en Science, Technologie, Santé. Université de Limoges,(2004)page171.

19)Ron Z.,et Rosenberg E., « clean-up of oil and biosurfactants», *Current Opinion in Biotechnology* 3, (2002): 249-252.

20)Eddouaouda K.,« Etude de potentiel biodegradatif des souches isolées de HassiMassoude contaminé par du pétrole : criblage, biodégradation de PAH et production de bio surfactant ». Thèse de doctorat en chimie industrielle. Blida. Université Saad Dahlab-Blida-1-. (2012).

21)Franzetti A., Gandolfi I., Raimondi C., Bestetti G., Banat I.M., Smyth T. J., Papacchini M., Cavallo M., and Fracchia L.,« Environmental Fate, Toxicity, Characteristics and Potential Applications of Novel Bioemulsifiers Produced by *VariovoraxParadoxus* 7bct5 ». *Bioresource Technology* 108, (2012): 245-251.

- 22) Cameron D.R., Cooper D.G., Neufeld R.J., « The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier ». *Applied and Environmental Microbiology* 54, (1988):1420–5.
- 23) Roux E., « New emulsifiers from plants. Comparison between oil bodies from plants and from yeasts ». Life Sciences INAPG, English.(2003).
- 24) Deleu M., Paquot M., Jacques P., Thonart P., Adriaensen Y. et Dufrene Y.F., « Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidylcholine monolayers ». *Biophysical Journal* 77, (1999): 2304-2310.
- 25) Grau A., Gomez Fernandez J.C., Peypoux F. et Ortiz A., « A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1438 no.(1999) : 307-319.
- 26) Razafindralambo H., Popineau Y., Deleu M., Hbid C., Jacques P., Thonart P. et Paquot M., « Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* : effect of lipid and peptide structural attributes ». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, (1998): 911-916.
- 27) Shepher DR., Rockey J., Sutherland I.W. et Roller S., « Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods ». *Journal of Biotechnology* 40,(1995): 207-217.
- 28) Grangemard I., Wallach J., Maget-dana R. et Peypoux F., « Lichenysin. A more efficient cation chelator than surfactin ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 90,(2001) : 199-210.
- 29) Yakimov M.M., Abraham W.R., Meyer H., Laura Giuliano, Golyshin P.N., « Structural characterization of lichenysin A components by fast atomic bombardment tandem mass spectrometry ». *Biochimica et Biophysica Acta* 1438 no. 2(1999): 273-80.
- 30) Cirigliano M.C. et Carman G.M. « Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica* ». *Applied and Environmental Microbiology* 48,(1984): 747-750.
- 31) Toren A., Segal G., Ron E.Z. et Rosenberg E., « Structure-function studies of the recombinant protein bioemulsifier AlnA ». *Environmental Microbiology* 4,(2002): 257-261.

- 32)** Torabizadeh H., Shojaosadati S.A. et Tehrani A., « Preparation and characterisation of bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its application in food products ». Iranian Research Organization For Science and Technology 29,(1996): 734-737.
- 33)** Neu T.R., « Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces ». Microbiological reviews 60, (1996): 151.
- 34)** Ron E.Z., et Rosenberg E., « Natural roles of biosurfactants ». *Environmental microbiology* 3, (2001): 229-236.
- 35)** Satpute S.K., Banat I.M, Dhakephalkar P.K., Banpurkar A.G., et Chopade B.A., « Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms ». Biotechnology advances 28,(2010): 436-450.
- 36)** Kumar A.S., Mody, K., et Jha, B., « Evaluation of biosurfactant/bioemulsifier production by a marine bacterium ». Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 79, (2007): 617–621.
- 37)** Amaral P. F. F., da Silva, J. M., Lehocky, M., Barros-Timmons, A. M. V., Coelho, M. A. Z., et Marrucho, I. M., « Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica* ». Process Biochemistry 41,(2006): 1894–1898.
- 38)** Atlas R.M., « Microbial degradation of petroleum hydrocarbons—an environmental perspective ». Microbiology Reviews 45,(1981): 180–209.
- 39)** Girvan M. S., Campbell C. D., Killham K., Prosser J. I., et Glover L. A., « Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation ». *Environmental Microbiology* 7 no.3(2005): 301–313
- 40)** Söhngen N. L., « Benzine Petroleum, paraffin and paraffin as a carbon source and source of energy for microbes ». Zentralblatt für Bakteriologie und Infektionskrankheiten 2. Abt 2 en, (1913) 37, 595. Allemand.
- 41)** Prince R., « The Microbiology of Marine Oil Spill Bioremediation ». In Ollivier B, Magot M (ed), Petroleum Microbiology. ASM Press, Washington, DC 16, (2005): 317-335
- 42)** Colwell R.R., et Walker J. D., « Ecological aspects of microbial degradation of oil in the marine environment ». *CRC Critical Reviews in Microbiology* 4, (1977): 23-45.

- 43) Leahy J. G., Somerville C. C., Cunningham K. A., Adamantiades G. A., Byrd J. J., et Colwell R. R., «Hydrocarbon mineralization in sediments and plasmid incidence in sediment bacteria from the Campeche Bank ». *Applied and Environmental Microbiology* 56,(1990):1565-1570.
- 44) Floodgate G.D., « The bacteriology of oil epuration in the Wildlife Sanctuary for the Gulf Region ». In: Abuzinada AH, Krupp F (eds) Courier Forschungsinstitut Senckenberg, in press(1994).
- 45) Yakimov M., Peter N.G., et Wolf-Rainer A., « Alcanivorax borkumensis gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 48,(1998):339-348.
- 46) Sheryle E.D., James P.G., Russell P.H., Lara J.C., et James T.S., « *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium from Marine Sediments », *International Journal Of Systematic Bacteriology*.(1995) :116-123.
- 47) Head I.M., Jones D.M., Roling W.F.M., « Marine microorganisms make a meal of oil ». *Nat Rev Microbiol* 4, (2006):173-182.
- 48) Rodriguez-Blanco A., Antoine V., Pelletier E., Delille D., et Ghiglione J.F., « Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea ». *Environmental pollution* 158, (2010): 663– 673.
- 49) Rahman K.S.M., Rahman T.J., Kourkoutas Y., Petsas I., Marchant R., et Banat I.M., « Improved bioremediation of n-alkanes using petroleum sludge modified bacterial consortium with rhamnolipid and micronutrients ». *Bioresource Technology* 90,(2003):159-168.
- 50) Satpute S.K., Banpurkar A.G., Dhakephalkar P.K., Banat I.M., et Chopade B.A., « Methods for Investigating Bio-surfactants and Bioemulsifiers: An Examination ». *Critical Reviews in Biotechnology* 30 no. 2(2010): 127-44.

- 51)**Viramontes R. S., Portillo R.M. C., Ballinas C.M. L., Torres M. J. V., Rivera C. B. E., et Nevarez M.G. V., « Selection of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soil ». *Brazilian Journal of Microbiology* 41 no.3(2010):668-75.
- 52)**Monteiro A.S., Bonfim M.R., Domingues V.S., Corrêa A. J., Siqueira E.P., Zani C.L., et Santos V.L., « Identification and characterization of yeasts producing bioemulsifiers isolated from the effluents of a dairy industry ». *Bioresource Technology* 101 no.14(2010) : 5186-93.
- 53)**Souza F. A. S. D., Salgueiro A. A., et Albuquerque C. D. C., « Production of bioemulsifier by *Yarrowia lipolytica* in sea water using diesel oil as the carbon source ». *Eng* 29,(2012): 61–67.
- 54)**Ardle MC Laboratory for Cancer Research, University of Wisconsin–Madison, Madison, Wisconsin Elsevier Inc. « Methods in Enzymology,ISSN ». (2009) :332-341.
- 55)**Matthieu T., et Simon D., « La Lyophilisation ou Cryodessiccation » Université Jean Monnet de Saint-Etienne (2010): 3-4.
- 56)**Elena I.M., Cristiana R. I. « surfactant-protein binding isotherms ». (2011) :429 – 433.
- 57)**Smyth T. J.P., Rudden M., Tsaousi K., Marchant R., et Banat I. M., « Protocols for the Isolation and Analysis of Lipopeptides and Bioemulsifiers ». In: T.J. McGenity et al. (eds.), *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*, Springer Protocols Handbooks (2016.a)
- 58)**Rahman, K.S.M., et Gakpe E., « Production, characterization and applications of biosurfactants ». *Review Biotechnology* 7 no.2(2008): 360-370.
- 59)** Patel R.M., et Desai A.J., « Surface active properties of rhamnolipides from *Pseudomonas aeruginosa* G3S ». *Journal of Basic Microbiology* 37,(1997) :281-286.
- 60)**Gabet S., « Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique ». Thèse de doctorat de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau.(2004) : 177.

- 61) Wei Yu-Hong, Chien Liang chou et Jo-shu Chang.« Rhamnolipid production by indigenous *P.aeruginosa* J4 originating from petrochemicals wastes ». *Biochemical Engineering Journal* 27(2005): 146-154.
- 62) Smyth T.J.P., Perfumo A., Marchant R., Banat I.M., « Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids » ,dans *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* , ed Timmis KN, éditeur. (Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag;).(2016b).
- 63) Willumsen P.A., Karlson U., « Screening of bacteria, isolated from soils contaminated with PAHs, for the production of bio-surfactants and bioemulsifiers ». *Biodégradation* 7 no.(1997):415-423.
- 64) Kaplan N., Rosenberg E., « Distribution of exopolysaccharides and production of bioemulsifier by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413 ». 44 no.6(1982): 1335-41.
- 65) Juan C. C.C., Manuel J .B., Susana del C. De la Rosa G., Manuela R .E., et Benjamín O.O.M., « Emulsifying activity and stability of a non-toxic bioemulsifier synthesized by *Microbacterium* sp MC3B-10 ». *International Journal of Molecular Sciences* 14,(2013):18959–18972.
- 66) Boyle C.D., Reade A.E., « Characterization of two extracellular polysaccharides from marine bacteria ». *Applied and Environmental Microbiology* 46,(1983):392–399.
- 67) Sen R., « Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR ». *Progress in Energy and Combustion Science* 34,(2008):714–724.
- 68) Munstermann B., Poremba K., Lang S., Wagner F., « Studies on environmental compatibility: influence of (bio)surfactants on marine microbial and enzymatic systems ». *Proceedings of the International Symposium on Soil Decontamination Using Biological Processes, Karlsruhe, Germany*,(1992):414–420.
- 69) Stratton H.M., Brooks P.R., Griffiths P.C., Seviour R.J., « Cell surface hydrophobicity and mycolic acid composition of *Rhodococcus* strains isolated from activated sludge foam ». *J Ind Microbiol Biotechnol* 28,(2002) :264–267.
- 70) Zheng C.Li.Z., Su, J., Zhang, R., Liu, C., and Zhao.M., « Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1 ». *Journal of Applied Microbiology* 113,(2012):44–51.

- 71) Panjiar N., Sachan S. G., et Sachan A., « Diversity of biosurfactant-producing *Streptomyces* isolates from hydrocarbon-contaminated soil ». *International Journal of Pharma and Bio Sciences*.(2013).
- 72) Campos J. M., Stamford T. L. M., et Sarubbo L. A., « Production of abioemulsifier with potential application in the food industry ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172, (2014):3234–3252.
- 73) Ahmed E. F., and Hassan S. S., « Antimicrobial activity of a bioemulsifier produced by *Serratiamarcescens*S10 ». *Journal of Al-Nahrain University* 16, (2013):147–155.
- 74) Uzoigwe C.J., Burgess G. J., Ennis C. J., et Rahman K.S.M., « Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches ». *Frontiers in Microbiology*, (2015):6- 212.
- 75) Cooper D.G., et Goldenberg B.G., « Surface-active agents from two *Bacillus* species ». *Applied and Environmental Microbiology* 53,(1987):224–229.
- 76) Morikawa M., Daido H. Takao T. Murata S., Shimonishi Y., Imanaka T., « A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38 », *Bacteriology Journal*, V.175,(1993) : 6459-6466.
- 77) Smyth T. J.P, M. Rudden, K. Tsaousi, R. Marchant, and I. M. Banat « Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids ». In: T.J. McGenity et al. (eds.), *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*.(2016.b).
- 78) Liang T.W., Wu, W.T C.C., Cheng Y.C. Chen C.L., Wang, I.L., et Wang S.L. Wang. « Exopolysaccharides and Antimicrobial Biosurfactants Produced by *Paenibacillus macerans* TKU029 ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172,(2014):933–950.
- 79) Gudiña E. J., Pereira J. F.B., Costa R., Evtuguin D.V., Coutinho J. A.P., Teixeira J. A., Rodrigues L. R., « Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil ». *Microbiology and Cell Factories* 14(2015):14.
- 80) Li X, A. Li, C. Liu, J. Yang, F. Ma, N. Hou, Y. Xu, N. Ren. « Characterization of the extracellular bioemulsifier of *Bacillus mojavensis* XH1 and the enhancement of demulsifying efficiency by optimization of the production medium composition ». *Process Biochemistry* 47, (2012) :626–634.

- 81)** Dubois M., Gilles K. A., Hamilton J. K., Rebers P. A. et Smith F., « Colorimetric method for determination of sugars and related substances ». *Analytical Chemistry* 28, (1956):350-356.
- 82)** Santos D. K.F, Rufino R. D., Luna J. M., Santos V. A., Salgueiro A. A., Sarubbo L. A., « Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor ». *Journal of Petroleum Science and Engineering* 105, (2013):43–50.
- 83)** Petrikov K., Delean Ya., Surin A., Ponamareva O., Puntus I., Filonov A., Boronin A., « Glycolipids of *Pseudomonas* and *Rhodococcus* soil-degrading bacteria used in bioremediation preparations: Formation and structure ». *Process Biochemistry* 48, (2013):931–935.
- 84)** Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kitamoto D., « Formation of the two novel glycolipid biosurfactants, mannosylbitol lipid and annosylarabitol lipid by *Pseudozyma* JCM 11752 ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 96, (2012):931–938.
- 85)** Bezza F. A., et Chirwa E.M. N., « Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2 ». *Biochemical Engineering journal* 101, (2015):168-178.
- 86)** Ebru Dulekgurgen UIUC'04.Total Carbohydrates Protocol. web.itu.edu.tr/~dulekgurgen/Carbs.pdf. Date de consultation: (02/09/2017).
- 87)** Singer M.E., « Microbes and Oil Recovery » *Texas : Bioresource publications.* (1985).
- 88)** Raza Z.A., Rehman A., Khan M.S., et Khalid Z.M., « Improved Production of Biosurfactant by a *Pseudomonas Aeruginosa* Mutant Using Vegetable Oil Refinery Wastes ». *Biodegradation* 18 no. 1 (2007): 115-121.
- 89)** Bannat I.M., et Dessai J.D., « Characterization of bio-surfactant and their use in the elimination of pollution ». *Journal of Engineering in life sciences* (1995).
- 90)** Cha M., Lee N., Kim M., Lee S., « Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant to *Pseudomonas putida* ». *Bioresource Technology* (2008):992192–2199.

- 91)** Samadi N., Abadian N., Akhavan A., Fazeli M.R., Tahzibi A., Jamalifar H., « Biosurfactant Production By The Strain Isolated From Contaminated Soil », *Journal of biological sciences* 7 no. 7 (2007):1266-1269.
- 92)** Joice A.P., et Parthasarathi R., « Optimization of the production of biosurfactants *Pseudomonas aeruginosa* PBSC1 ». *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, (2014):140-151.
- 93)** Santa A.M., Sebastian G.V., Menezes E.P., Alves T.L.M., Santos A.S., Pereira J.N., et Freire D.M.G., « Production of bio-surfactants of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in Braz oil media ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 19, (2002):159 – 166.
- 94)** Wu J.Y., Yeh K.L., Lu W.B., Lin C.L., Chang J.S., « Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. ». *Bioresource Technology* 99, (2008) :1157 – 1164.
- 95)** Garima B., Swaranjit S.C., et Harish K.C., « Biosurfactants from Fungi: A Review. Department of Chemistry, Sant Longowal Institute of Engineering and Technology », *Institute of Microbial Technology*, India. (2013).
- 96)** Abdel-Mawgoud A.M., Aboulwafa M.M., Hassouna N.A.H., « Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5. ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 150, (2008) :305 – 325.
- 97)** Meyer H.P., « Sustainability and biotechnology ». *Organic Process Research and Development* 15, (2011) :180-188.
- 98)** Silva G.P., Mack M., et Contiero J.G., « a promising and abundant carbon source for industrial microbiology ». *Biotechnology Advances* 27, (2009) : 30 – 39.
- 99)** Rashedi H., Jamshidi E., Assadi M., Bonakdaepour B., « Isolation and production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian southern wells oil ». *Journal of Environmental Sciences and Technology* 2, (2005) : 121 – 127.
- 100)** Chen L., Riadi., Suh S.J., Ohman D.E., Ju L.K., « Degradation and synthesis kinetics of quorum-sensing autoinducer in *Pseudomonas aeruginosa* cultivation. ». *Journal of Biotechnology* 117, (2005) :1 – 10.

- 101)** Pepi M., Cesaro A., Liut G., et Baldi F., « An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. ANT-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid » *FEMS Microbial Ecology* 53,(2004): 157-166.
- 102)** Thavasi R., Jayalakshmi S., Balasubramanian T., et Banat I.M., « Production and Characterization of a Glycolipid Biosurfactant from *Bacillus Megaterium* Using Economically Cheaper Sources » *World Journal of Microbiological Biotechnology* 24, no. 7(2008): 917–925.
- 103)** Sarubbo L.A., de Luna J.M., et de Campos-Takaki G.M., « Production and stability studies on a bioemulsifier obtained from a new strain of *Candidaglabrata* UCP 1002 », *Electronic Journal of Biotechnology* 9 no.4(2006):390-400.
- 104)** Saimmai A., Udomsilp S., et Maneerat S., « Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium *Inquilinus limosus* KB3 grown on low-cost raw materials » *Annals of Microbiology* 63,(2013):1327–1339.
- 105)** Haddad N.I., Namir I.A., Wang J., et Mu B., « Identification of a Biosurfactant Producing Strain: *Bacillus subtilis* HOB2 » *Protein and Peptide Letters* 7,(2009):7-13.
- 106)** Ferradji F., « étude des voies métaboliques de la biodégradation des hydrocarbures en vue d'une application d'un procédé de biodépollution des eaux de mer ». Thèse de doctorat en chimie industrielle. Université SAAD DAHLAB-BLIDA.(2014).
- 107)** Biao R. A., Khopade X., Liu K., Mahadik L., Zhang C., et Kokare., « Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4 » *Desalination* 285,(2012):198–204.
- 108)** Luna V.M.A., Esparza G.F., Canizares V.R.O., et Rodriguez V.R., « Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. » *Process Biochemistry* 42, (2007):310–314.
- 109)** Imane U., Silva C.G. A., Pozo C, et Calvo C., « Biodegradative potential and characterization of bioemulsifiers of marine bacteria isolated from samples of seawater, sediment and fuel extracted at 4000 m of depth (Prestige wreck) » . (2010) .

- 110)** Zheng C., Jianglin H., Yongli W., Manman W., Zhiyong H., « Hydrocarbon degradation and bioemulsifier production by thermophilic *Geobacillus pallidus* strains ». *Bioresource Technology* 102,(2011) :9155–9161.
- 111)** Al-Mallah, M., Goutx M., Mille G., et Bertrand J. C., « Production of emulsifying agents during growth of a marine *Alteromonas* in seawater with eicosane as carbon source, a solid hydrocarbon ». *Oil and Chemical Pollution* 6,(1990):289-305.
- 112)** Ravindra Pal Singh, Mahendra K. Shukla, Avinash Mishra, Puja Kumari, C.R.K. Reddy, Bhavanath Jha., « Isolation and characterization of exopolysaccharides from seaweed associated bacteria *Bacillus licheniformis* ». *Carbohydrate Polymers* 84,(2011) : 1019–1026.
- 113)** Saikia R.R., Deka S., Deka M., et Banat I .M., « Isolation of Biosurfactant-Producing *Pseudomonas aeruginosa* 29 from Oil-Contaminated Soil and Evaluation of Different Nitrogen Sources in Biosurfactant Production ». *Annals of Microbiology* 62,(2012): 753–763.
- 114)** Peele K. A, Teja C.V. R., et Kodali V.P., « Emulsifying activity of a biosurfactant produced by a marine bacterium ». *3 Biotech* 6, (2016):177.
- 115)** Patowary R., K. Patowary, M. C. Kalita et S. Deka., « Utilization of Paneer Whey Waste for Cost-Effective Production of Rhamnolipid Biosurfactant ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 180,(2016):383–399.
- 116)** Abouseoud M., Maachi R., Amrane A., Boudergua S., Nabi A., « Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens* ». *Desalination* 223,(2008):143–151.
- 117)** Noparat P, Maneerat S. et Saimmai A., « Application of Biosurfactant from *Sphingobacterium spiritivorum* AS43 in the Biodegradation of Used Lubricating Oil ». *Applied Biochemistry and Biotechnology* 172,(2014):3949–3963.

