

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 GENIE DES PROCEDES**

**Spécialité : Génie de l'environnement**

Intitulé du mémoire

**Production et application d'un biosurfactant  
issue de la souche bactérienne *Bacillus  
amyloliquifaciens* en agroalimentaire**

**Présenté par : KLIEL Asma**

**Encadré par : Pr.A.BADIS**

**Co-promotrice: KHALOUIA Lamia**

Année universitaire 2018/2019

# Remerciement

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

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

J'exprime ma plus profonde reconnaissance et gratitude à ma co-promotrice madame **KHELOUIA Lamia**, enseignante à l'institut des sciences et techniques appliquées de Blida qui m'a aidé et orienté et pour tous les conseils précieux qu'elle m'a prodigués. Je la remercie de sa disponibilité et de sa gentillesse pour m'éclairer de ses compétences.

Avec beaucoup de respect, je remercie **Pr. DJEDRI Safia** pour sa confiance et ces conseils qui ont été pour moi une aide inestimable ; merci profondément pour le temps consacré.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur **DAHMOUCHE Rachid** responsable du laboratoire de chimie des solutions à l'université Saad Dahleb de Blida qui m'a toujours facilité et donné tous les moyens pour le bon déroulement de mon travail au sien du laboratoire.

Je remercie profondément Monsieur **TEFFAHI Djamel**, responsable de laboratoire d'hygiène de Blida, qu'il a accepté d'ouvrir les portes de son laboratoire en nous fournissant tout ce dont j'ai besoin, son aide, ses encouragements.

J'adresse aussi mon remerciement à l'ensemble des techniciens des laboratoires du département de génie des procédés.

Mes remerciements les plus vifs s'adressent aussi aux membres de jury d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer mon travail.

Mes vifs remerciements vont également à mes chers parents, mon mari, mes sœurs, mes frères et ma belle-famille pour leur aide et le soutien qu'ils m'ont apporté, pour leur encouragement, patience et gentillesse, sans oublier mon petit Wassim, et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail. Qu'ils trouvent ici ma sincère reconnaissance.

## ملخص

في هذا العمل ، أجرينا دراسة حول إنتاج وتوصيف وتطبيق المواد الغذائية من مادة مفاعل حيوي من سلالة محبة للحرارة معزولة عن تربة رملية ملوثة بالهيدروكربونات البترولية (منطقة حاسي مسعود ، جنوباً الجزائر). تكشف النتائج التي تم الحصول عليها عن السلالة الفعالة ما يلي: (أ) أظهرت السلالة المحبة للحرارة الأميلوليفيكاسيانس قدرة إنتاجية كبيرة للعوامل الحيوية ، (ب) يكون التركيز الأمثل لعامل حيوي في الضمادة هو 0.10 جم / لتر و 0.16 جم / لتر من الليسيثين فول الصويا لعدم فصل المراحل ، (ج) للمضاد الحيوي من سلالة عصية الأميليكيفاسيانس لها خصائص فيزيائية كيميائية مثيرة للاهتمام ؛ إنه مستقر حرارياً للغاية ، ولديه ثبات جيد جداً في درجة الحموضة (د) تبين السيطرة البكتريولوجية أن خلجاننا الذي يحتوي على المادة الفعالة بيولوجياً ذو نوعية جيدة (هـ) الخل الذي يحتوي على المادة الفعالة الحيوية يبقى ثابتاً طوال عملية الطرد المركزي من ناحية أخرى ، يتم فصل الخل الذي يحتوي على الليسيثين الصويا إلى مرحلتين في الطرد المركزي من 6000 دورة لمدة 10 دقيقة (و) دور مستحلب ، سماكة وتثبيتها من biosurfactant من العسوية الأميليكوليفياتين سلالة هو التحضير للاختبارات. صلصة الخل التي أثبتت خصائصها (الفيزيائية والكيميائية والميكروبيولوجية وريولوجية) مماثلة لتلك التي خلغ الملابس التجارية - يومياً.

**الكلمات المفتاحية:** بكتيريا محبة للحرارة ، مادة حيوية ، مستحلب ، ليسيثين الصويا ، صلصة السلطة

## Résumé

Dans ce travail nous avons entrepris une étude sur la production, la caractérisation et l'application en agroalimentaire d'un biosurfactant issu d'une souche thermophile isolée à partir d'un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers (région de Hassi Messaoud, sud d'Algérie). Les résultats obtenus pour la souche performante révèlent que : **(a)** la souche thermophile *bacillus amyloliquifaciens* a montré une capacité productrice importante de biosurfactants, **(b)** la concentration optimale du biosurfactant dans la vinaigrette est 0.10 g/l et 0.16 g/l du lécithine de soja pour la non-séparation des phases, **(c)** le biosurfactant de la souche *bacillus amyloliquifaciens* détient des propriétés physico-chimiques intéressantes; il est très stable thermiquement, et il présente une très bonne stabilité de pH **(d)** le contrôle bactériologique montre que notre vinaigrette qui contient le biosurfactant est de bonne qualité **(e)** la vinaigrette qui contient le biosurfactant est reste stable tout au long de centrifugation par contre la vinaigrette qui contient la lécithine de soja est séparé en deux phases dans la centrifugation de 6000 tours pendant 10 min **(f)** un rôle émulsifiant, épaississant et stabiliseur du biosurfactant de la souche *bacillus amyloliquifaciens* est assuré par des essais de préparation d'une sauce vinaigrette qui a prouvé des caractéristiques (physico-chimiques, microbiologiques et rhéologiques) similaires à celles de la vinaigrette commerciale –Daily-.

**Mots clés :** bactérie thermophile, biosurfactant, émulsifiant, lécithine de soja, vinaigrette

## Summary

In this work we undertook a study on the production, characterization and application in the food industry of a biosurfactant from a thermophilic strain isolated from a sandy soil contaminated by petroleum hydrocarbons (Hassi Messaoud region, south from Algeria). The results obtained for the performing strain reveal that: (a) the thermophilic strain *Bacillus amyloliquifaciens* has shown a significant productive capacity for biosurfactants, (b) the optimal concentration of the biosurfactant in the dressing is 0.10 g / l and 0.16 g / l of lecithin soybeans for non-separation of the phases, (c) the biosurfactant of the *Bacillus amyloliquifaciens* strain has interesting physicochemical properties; it is very thermally stable, and it has very good pH stability (d) the bacteriological control shows that our vinaigrette which contains the biosurfactant is of good quality (e) the vinaigrette which contains the biosurfactant is remains stable throughout centrifugation on the other hand, the vinaigrette which contains the soy lecithin is separated into two phases in the centrifugation of 6000 revolutions for 10 min (f) an emulsifying, thickening and stabilizing role of the biosurfactant of the *Bacillus amyloliquifaciens* strain is ensured by preparation preparation tests. a dressing sauce which has proven characteristics (physico-chemical, microbiological and rheological) similar to those of the commercial dressing - Daily-.Key words: thermophilic bacteria, biosurfactant, emulsifier, soy lecithin, dressing

# Abréviations

E<sub>24</sub> : Activité émulsifiante pendant 24 heures.

LB : Luria Burtani.

MM : Milieu minimum.

pH : potentiel d'hydrogène.

°C : degré Celsius.

g : gramme.

mg : milligramme.

ml : millilitre.

% : pourcentage.

Dy/cm : dyne/ centimètre (unité de la tension de surface).

O/W : oil/water.

W/O : water/oil.

H : heure.

Tr/min : tours/minutes.

S : second.

TSE : eau physiologique.

UFC : unité formant des colonies.

# Liste des figures

Figure 1.1 : schéma récapitulatif du test d'émulsion E <sub>24</sub> .....	06
Figure 1.2 : biosurfactant représentatif produits par des microorganismes qui utilisent des substrats solubles et/ou insolubles dans l'eau.....	08
Figure 2.1 : la bactérie <i>bacillus amyloliquifaciens</i> .....	18
Figure 2.2 : sols contaminés par le pétrole brut (Hassi Messoud).....	19
Figure 3.1 : le biosurfactant extrait par la souche <i>bacillus amuloliquifaciens</i> .....	28
Figure 3.2 : vinaigrette de lécithine de soja.....	28
Figure 3.3 : vinaigrette de biosurfactant.....	29
Figure 3.4 : l'évolution de la viscosité apparente des échantillants de la sauce vinaigrette étudiés en fonction de la vitesse de cisaillement à T= 22 °C.....	34
Figure 3.5 : centrifugation de vinaigrette qui contient la lécithine de soja .....	31
Figure 3.6 : centrifugation de vinaigrette qui contient le biosurfactant.....	32
Figure 3.7 : dénombrement des microorganismes dans la vinaigrette qui contient le biosurfactant .....	33
Figure 3.8 : vue macroscopique de la vinaigrette qui contient.....	34
Figure 3.9 : l'évolution de la température en fonction de température.....	35
Figure 3.10 : papier pH.....	35
Figure 3.11 : la variation de pH de biosurfactant en fonction de temps.....	36
Figure 3.12 : la variation de pH de lécithine de soja en fonction de temps.....	36
Figure 3.13 : la variation de pH de vinaigrette commerciale Daily en fonction de temps.....	37

# Liste des tableaux

Tableau 1.1 : principaux types de biosurfactants produits par différents microorganismes .....	07
Tableau 1.2 : les différentes domaines d'application des biosurfactants.....	12
Tableau 2.1 : matériels utilisés .....	17
Tableau 2.2 : la quantité des ingrédients que nous avons utilisé pour la sauce vinaigrette étudié pour 100 g.....	23
Tableau 2.3 : les différents concentrations de biosurfactant et la lécithine de soja.....	23
Tableau 3.1 : les étapes de la production de biosurfactant.....	26
Tableau 3.2 : les résultats de dénombrement des microorganismes de la vinaigrette qui contient le biosurfactant comme agent émulsifiant.....	33

# Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des abréviations

Liste des figures

Listes des tableaux

Introduction générale.....01

## Chapitre 01 : Revue bibliographique

1.1 Biosurfactant.....03

1.2 Classification des biosurfactants.....03

1.3 Production des biosurfactants.....04

1.4 Microorganismes producteurs des microorganismes.....06

1.5 Facteurs influençant la production des biosurfactants.....08

1.5.1 Influence de la source de carbone .....08

1.5.2 Influence de la source d'azote .....08

1.5.3 L'aération et l'agitation.....09

1.5.4 Concentration en sel .....09

1.5.5 Effet de pH .....09

1.5.6 Effet de température .....10

1.5.7 Influence des éléments minéraux e des ions du milieu de culture .....10

1.6 Propriétés des biosurfactants .....10

1.6.1 Caractéristiques techniques excellentes.....11

1.6.2 Stabilité thermique et chimique.....11

1.6.3 Caractéristique écologique.....11

1.7 Application des biosurfactants .....11

1.7.1 Ingrédients de la formulation des aliments.....12

1.7.2 Agents anti adhésifs.....13

1.7.3 Agents émulsifiants.....13

1.7.3.1 Huile-dans-l'eau (O/W).....14

1.7.3.2 Eau-dans-huile (W/O).....	14
1.8 Avantages des biosurfactants.....	15

## Chapitre 02 : partie expérimentale

2.1 Produits et matériels utilisés.....	17
2.1.1 Produits utilisés.....	17
2.1.2 Matériels utilisés.....	17
2.2 La souche bactérienne utilisés.....	18
2.2.1 Définition.....	18
2.2.2 Origine de la souche bactérienne utilisé.....	19
2.3 Criblage des souches productrices des biosurfactants.....	19
2.4 Production de biosurfactant.....	20
2.5 Essai d'application de biosurfactant dans le domaine agroalimentaire.....	21
2.5.1 La technologie de la préparation de la sauce vinaigrette.....	22
2.5.1.1 Préparation des échantillons.....	22
2.5.1.2 Préparation de la phase aqueuse.....	22
2.5.1.3 Préparation de la phase huileuse .....	22
2.5.1.4 Préparation de l'émulsion .....	23
2.6 La caractéristique rhéologique des échantillons de la sauce vinaigrette.....	23
2.7 Contrôle bactériologique.....	24
2.7.1 Principe.....	24
2.7.2 Principe de dilution successive .....	24
2.7.3 mise en gélose .....	25
2.7.4 lecture .....	25
2.7.5 calcul .....	25
2.8 stabilité physico-chimique.....	26

## Chapitre 03 : Résultats et discussions

3.1 production des biosurfactants.....	27
3.2 essai d'application en agroalimentaire dans la préparation de la sauce vinaigrette.....	29
3.2.1 vinaigrette de lécithine de soja .....	29
3.2.1 vinaigrette de biosurfactant.....	30
3.3 la caractérisation rhéologique des échantillants de la sauce vinaigrette .....	31
3.4 étude de la stabilité de vinaigrette à la centrifugation .....	33
3.5 contrôle bactériologique.....	34
3.6 vue microscopique de vinaigrette .....	36
3.7 stabilité physico-chimique.....	36
3.7.1 mesure de température.....	36
3.7.2 mesure de pH.....	37
Conclusion générale.....	40

Références

Annexes

# **Introduction générale**

# Introduction générale

Les tensioactifs sont généralement des composés organiques utilisés dans de nombreuses industries (textile, cuir, métallurgie, pétrolière, pétrochimie... etc) et sont également présents dans les formulations de produits de consommation courante tels que les détergents, les cosmétiques, les produits agroalimentaire, les produits pharmaceutiques....

En outre, ils sont utilisés dans le domaine environnemental comme la dispersion des nappes de pétrole déversé en milieu marin, ainsi la remobilisation des sols contaminés par les substances insolubles (hydrocarbures) [48].

Les biosurfactants sont des molécules tensioactives produites par certains microorganismes. Ceux-ci possèdent de nombreuses propriétés tels que la haute biodégradabilité, la non toxicité, la meilleure fonctionnalité dans des conditions extrêmes (pH acides, salinités et températures élevées, etc.) [91], Et enfin ils peuvent être produits sur des substrats renouvelables [77,78]), ce qui permet leur utilisation dans différents domaines d'application tels que l'environnement, l'industrie pétrolière, l'agronomie [79]. Les sites contaminés par les hydrocarbures sont des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes, notamment les bactéries, ayant une capacité productrice élevée de biosurfactant.

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

L'objectif de ce présent travail est d'étudier la production de biosurfactants, issus d'une souche thermophile isolée localement, en vue d'une application en agroalimentaire.

Ce manuscrit s'articule autour de trois parties :

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

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

**Chapitre 01**  
**Revue**  
**bibliographique**

## 1.1 Biosurfactants

Les biosurfactants (ou surfactants biologiques) sont définis comme étant des molécules amphiphiles actives aux surfaces et produites par des cellules vivantes : des levures, bactéries et champignons. Leur structure dépend du type de microorganisme, de la nature du substrat et des conditions de la production [1,2]. Ils sont capables de s'accumuler à l'interface entre deux phases non miscibles comme l'huile et l'eau, tout en réduisant la tension de surface, et par conséquent, ils permettent à celles-ci de se mélanger et de s'interagir plus facilement.

## 1.2 Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, poids moléculaire, propriétés physico-chimiques, mode d'action et origine microbienne. Généralement, le groupement hydrophile (soluble dans l'eau) est constitué par une variété de groupements fonctionnels d'acides aminés, protéines, peptides cycliques, acides carboxyliques, polysaccharides et (mono ou di) alcool gras ; et le groupement hydrophobe non polaire (soluble dans l'huile) est une chaîne hydrocarbonée aliphatique saturée ou insaturée (C<sub>8</sub> à C<sub>22</sub> : linéaire ou ramifié), un acide gras à longue chaîne, hydroxy-acide gras ou  $\alpha$ -alkyl- $\beta$ -hydroxy-acide gras [3].

- Selon le poids moléculaire [4]

### Faible poids moléculaire

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

### Haut poids moléculaire ou polymères

Connus comme bioémulsifiants qui sont plus efficaces à stabiliser le complexe huile-eau émulsion sans une réduction importante de la tension de surface. Ils contiennent les groupes de protéines ou des lipopolysaccharides et des polysaccharides (hydrocolloïdes). La molécule de protéine peut s'interpénétrer dans la phase lipidique à

des degrés divers. La liaison spécifique est essentiellement électrostatique : Les groupes de tête des tensioactifs se lient à des groupes de charge opposés sur la protéine. La saturation de la liaison de tensioactifs anioniques est indépendante du pH et semble être contrôlée par les interactions hydrophobes de coopération.

➤ Selon la nature biochimique

Universellement, un biosurfactant typique est soit anionique ou neutre, il se compose de tête hydrophile (principalement des acides aminés, peptide ou phosphate cyclique, hydrate de carbone comme mono / disaccharides, polysaccharides) et une queue hydrophobe (essentiellement des acides gras insaturés, saturés, linéaires, ramifiés ou hydroxylés) [5, 6, 7, 8]. Pour cela on distingue cinq grandes classes de biosurfactants : Les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres [9].

Les glycolipides : sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acide hydroxyaliphatiques [9]. Les glycolipides les plus étudiés sont les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides.

Les lipopeptides : sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptide.

Les phospholipides: sont formés de groupements alcool, phosphate et de chaîne lipidique. Healy et Bognolo [9, 10] indiquent qu'ils sont présents dans tous les microorganismes.

Les lipopolysaccharides: ou polymériques sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras. Ce sont les biosurfactants possédant la masse molaire la plus élevée.

Les acides gras et lipides neutres: sont d'origine végétale, animale ou microbienne.

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biosurfactants les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides [11, 6, 10].

### **1.3 Production des biosurfactants**

Les microorganismes producteurs de biosurfactants se développent de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures [10, 12]. La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance, de la source de carbone utilisée et du type de microorganisme.

Les diverses applications de biosurfactants nécessitent une méthode facile, rapide et fiable pour découvrir les bactéries productrices de biosurfactants. Les techniques utilisées pour évaluer la

production du biosurfactant sont : le test de déplacement d'huile, l'activité hémolytique et la tension de surface et l'indice d'émulsification  $E_{24}(\%)$ .

#### -Activité hémolytique

L'hémolyse sur gélose au sang a été largement utilisée pour le criblage de bactéries productrices des biosurfactants. Cette technique a été découverte par Bernheimer et *al.* [13] elle a été déjà utilisée pour quantifier la surfactine [14] et les rhamnolipides [15]. Actuellement, de nombreux chercheurs utilisent cette technique pour la sélection de nouveaux isolats producteurs de biosurfactants [16].

#### -Tension de surface

Le phénomène de tension de surface peut être expliqué en termes d'énergie, c'est une mesure de l'énergie libre de surface par unité de surface nécessaire pour apporter une molécule au sein d'une phase à la surface. Augmenter la surface d'un liquide coûte de l'énergie, pour minimiser cette dernière, la plus part des liquides prennent la forme de la plus petite des surfaces. Car c'est la forme sphérique qui présente la surface la plus petite par rapport aux autres formes de volumes, en effet, la tension de surface est donnée par la relation :

$$\gamma = \frac{W}{\Delta A}$$

Avec : (W : travail ou l'énergie qu'il faut fournir « à température et pression constantes » pour accroître la surface du liquide d'une quantité.  $\Delta A$  : La tension de surface s'exprime en  $J/m^2$  ou  $mN/m$ ).

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

#### -Test de déplacement de pétrole

Cette technique est définie comme un test qualitatif de criblage des souches productrices des biosurfactants. Cette méthode est basée sur la caractéristique du biosurfactant à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau. La pression de surface du biosurfactant est capable de déplacer l'huile. Les solutions contenant plusieurs biosurfactants sont incapables de former des gouttes stables et par la suite un étalement total est observé sur la surface huileuse, tandis que, les solutions dépourvues de biosurfactants vont conserver la forme déposée sur la surface huileuse. Cette méthode est facile à réaliser, simple, sensible et reproductible. Cependant, cette technique n'est pas corrélée à la réduction de la tension de surface pour confirmer sa fiabilité [17].

### -Activité émulsifiante

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

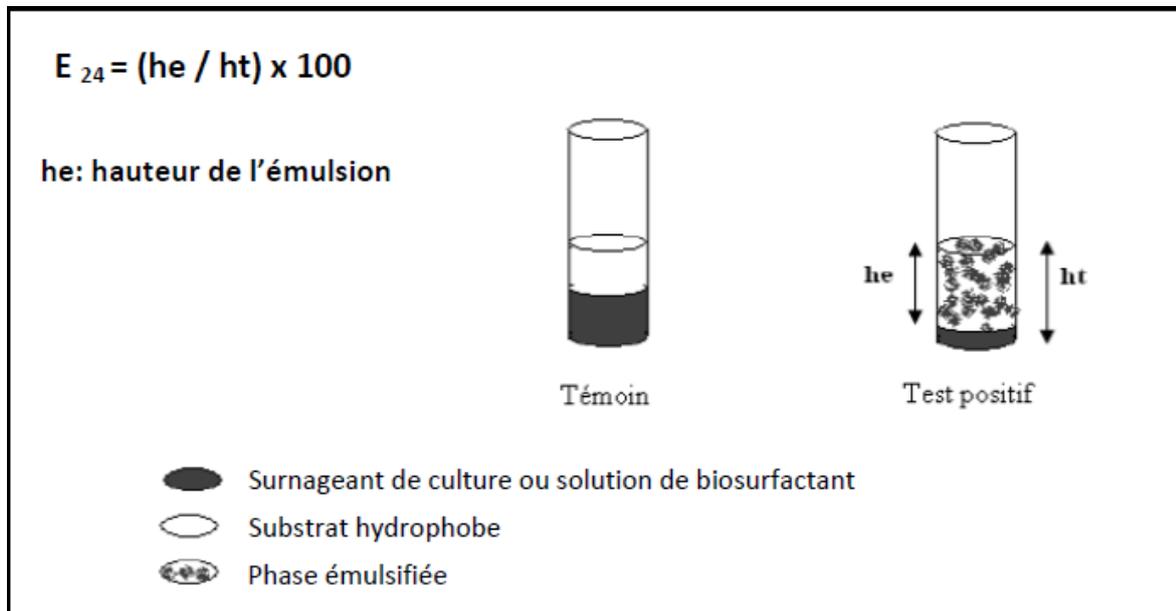


Figure 1.1 Schéma récapitulatif du test d'émulsion ( $E_{24}\%$ )

## 1.4 Microorganismes producteurs des biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie. Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries [1, 2]. Les Rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa*, la surfactine à partir de *Bacillus subtilis*, l'émulsan d'*Acinetobacter calcoaceticus* et sophorolipides de *Candida bombicola* sont quelques exemples d'agents tensioactifs microbiens (Figure 1.2). Quelques biosurfactants issus de différents microorganismes sont rassemblés dans le tableau 1.1.

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

Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules. Par exemple, dans le cas du biosurfactant produit par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* UG2, le mélange obtenu contient quatre rhamnolipides et comme aussi rapporté par Van dyke et Abalos

[18, 19], ils indiquent que sept homologues de rhamnolipides ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Tableau 1.1 : Principaux types de biosurfactants produits par différents microorganismes [1, 20].

<b>Microorganismes</b>	<b>Type des biosurfactants</b>	<b>Références</b>
<i>Artrobacter sp. RAG-1</i>	Hétéropolysaccharides	[21]
<i>Artrobacter sp. MIS38</i>	Peptidolipides	[22]
<i>Artrobacter sp.</i>	Lipides de tréhalose, Lipides de saccharose	[23]
<i>Bacillus licheniformis</i>	Peptidolipides	[24]
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactine	[25]
<i>Bacillus sp. AB-2</i>	Rhamnolipides	[26]
<i>Bacillus velezensis</i>	Peptidolipides	[27]
<i>Candida sphaerica</i>	Glycolipides	[28]
<i>Aspergillus ustus</i>	Glycolipoprotéines	[29]
<i>Candida bombicola</i>	Sophorolipides	[30]
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Glycolipides	[31]
<i>Ochrobactrum sp. 1C</i>	Glycolipides	[32]
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Glycopeptides	[33]
<i>Halomonas sp. ANT-3b</i>	Glycolipides	[34]
<i>Pseudomonas aeruginosa CPCL</i>	Rhamnolipides	[35]
<i>Pseudomonas fluorescens SH10-3B</i>	Viscosine	[36]
<i>Rhodococcus sp. ST5</i>	Glycolipides	[37]
<i>Rhodococcus sp. 33</i>	Polysaccharides	[38]
<i>Rhodococcus sp. TA6</i>	Lipides, Glycolipides	[39]
<i>Halomonas eurihalina</i>	Exopolysaccharides	[40]
<i>Staphylococcus sp. 1<sup>E</sup></i>	Lipopeptides	[41]
<i>Brevibacterium aureum</i>	Lipopeptides	[42]

<i>Brevibacterium sp. 7G</i>	Glycolipides	[32]
<i>Nocaridiopsis lucutensis</i>	Glycolipides	[29]

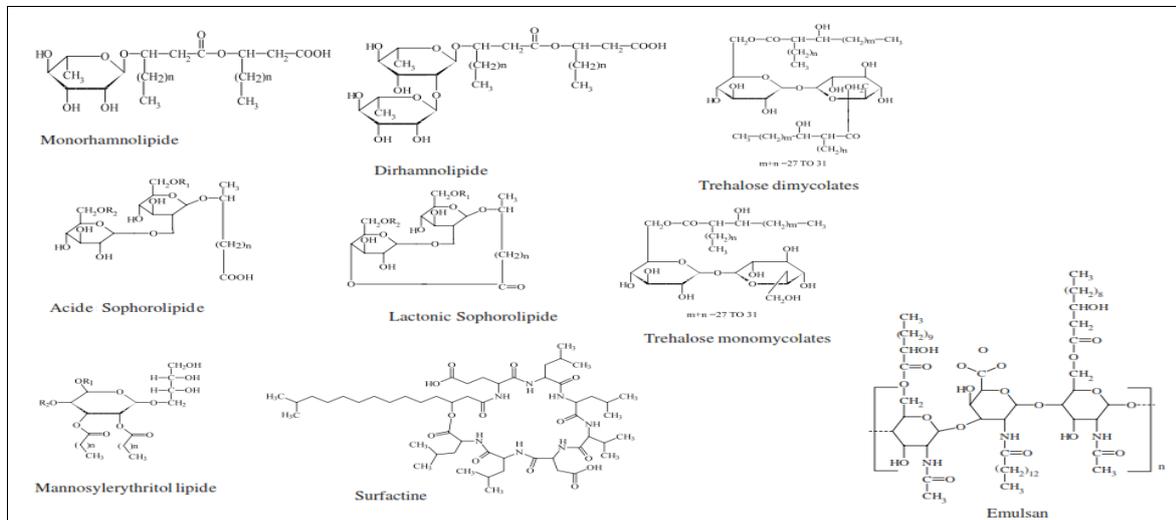


Figure 1.2 : Biosurfactants représentatifs produits par des microorganismes qui utilisent des substrats solubles et / ou insolubles dans l'eau [5, 6, 7, 8]

## 1.5 Facteurs influençant la production des biosurfactants

La composition et l'activité émulsifiante du biosurfactant dépendent non seulement de la souche du producteur, mais également des conditions de culture, donc de la nature de la source de carbone, de la source d'azote, des limites nutritionnelles et des paramètres chimiques et physiques. tel que la température, l'aération, les cations divalents et le pH influencent non seulement la quantité de biosurfactant produite, mais également le type de polymère produit [43].

### 1.5.1 Influence de la source de carbone

La qualité et la quantité de la production de biosurfactants sont influencées par la nature du substrat de carbone [44]. Le diesel, le pétrole brut, le glucose, le saccharose, le glycérol seraient une bonne source de substrat de carbone pour la production de biosurfactant [45].

### 1.5.2 Influence de la source d'azote

L'azote est important dans le milieu de production des biosurfactants, car il est essentiel à la croissance microbienne, car la synthèse de protéines et d'enzymes en dépend. Déférents

composés d'azote ont été utilisés pour la production de biosurfactants tels que l'urée peptone, l'extrait de levure, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, le nitrate de sodium, l'extrait de viande et des extraits de malt. Bien que l'extrait de levure soit la source d'azote la plus utilisée pour la production de biosurfactant, son utilisation en ce qui concerne la concentration dépend de l'organisme et du milieu de culture. Les sels d'ammonium et l'urée sont les sources d'azote préférées pour la production de biosurfactants par *Arthrobacter paraffineus*, alors que les nitrates favorisent la production maximale de tensioactifs chez *P. aeruginosa* [46]

### **1.5.3 L'aération et l'agitation**

L'aération et l'agitation sont des facteurs importants qui influencent la production de biosurfactants, car ils facilitent le transfert de l'oxygène de la phase gazeuse à la phase aqueuse. Il peut également être lié à la fonction physiologique de l'émulsifiant microbien. Il a été suggéré que la production d'agents bioémulsifiants peut augmenter la solubilisation de substrats insolubles dans l'eau et, par conséquent, faciliter le transport des nutriments vers les micro-organismes. Adamczak et Bednarski [46] ont observé que la meilleure valeur de production du tensioactif (45,5 g / l) était obtenue lorsque le débit d'air était de 1 vvm et que la concentration en oxygène dissous était maintenue à 50% de saturation.

### **1.5.4 Concentration en sel**

La concentration en sel d'un milieu particulier a également eu un effet correspondant sur la production de biosurfactant car les activités cellulaires des micro-organismes sont influencées par la concentration en sel. Néanmoins, des observations contraires ont été observées pour certains produits biosurfactants non affectés par des concentrations allant jusqu'à 10% (poids / volume), bien que de légères réductions de la CMC aient été détectées [45].

### **1.5.5 Effet de pH**

Desai et Banat [6] indiquent que pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Nocardia corynbacteroides* sont in affectées par des pH variant de 6,5 à 8,0. Mata-Sandoval *et al.* [49] ont montré que suivant le pH, les rhamnolipides produits avaient une structure différente et s'organisaient différemment. Par exemple, à un pH de 5,5, la structure était de forme lamellaire alors qu'à des pH supérieurs, des vésicules étaient formées. Le pH du milieu joue un rôle important dans la production de sophorolipides [58, 59].

### **1.5.6 Effet de température**

Les biosurfactants produits par des souches thermophiles résistent à des températures élevées ; les propriétés physico-chimiques des biosurfactants, produits par *Bacillus sp.* à des températures supérieures à 40 °C, si bien que la tension de surface, la tension interfaciale et l'efficacité de l'émulsification restent stables après autoclavage à 120 °C pendant 15 min [45, 37].

L'augmentation de la température provoque des altérations dans la composition des biosurfactants produits chez *Arthrobacter paraffineus* [38] et *Pseudomonas sp* DSM2874 [40].

### **1.5.7 Influence des éléments minéraux et des ions du milieu de culture**

La limitation de la concentration des éléments minéraux et ions peut avoir aussi un effet sur la production des biosurfactants au niveau quantitatif et qualitatif. Ainsi on peut observer une augmentation de la production en rhamnolipides en limitant l'apport en fer, en phosphate [56, 23, 6] et en magnésium [55].

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

L'addition du fer et du manganèse dans le milieu de culture stimule la production de biosurfactants chez *Bacillus subtilis* [54, 80] et *Rhodococcus sp.* [30]. Il semblerait qu'une concentration limitante en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de la production [52].

## **1.6 Propriétés des biosurfactants**

Les biosurfactants ont des meilleures propriétés moussantes et une plus grande sélectivité. Ils sont moins sensibles aux environnements extrêmes comme la température, le pH et la salinité. Ils sont biodégradables et non ou peu toxiques ce qui rend leurs applications environnementales intéressantes [48].

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

### **1.6.1 Caractéristiques techniques excellentes**

- Diminution de la tension interfaciale ( $\approx 0,1$  dy/cm) ;
- Diminution de la tension de surface ( $\approx 27$  dy/cm) ;
- Emulsifiants (50- 100%) ;

- Pouvoir moussant (mousse stable) ;
- CMC (concentration micellaire critique) (20- 200 mg/l) ;
- Pouvoir antibiotique ou fongicide.

### 1.6. 2 Stabilité thermique et chimique

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

### 1.6. 3 Caractéristiques écologiques

- Biodégradables et non toxiques ;
- Temps de stockage long ;
- Production à partir des déchets industriels (effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon,) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du coût de production ;
- Biocompatibilité et digestibilité : application dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels.

## 1.7 Application des biosurfactants

Les applications potentielles des biosurfactants sont : l'émulsion, la séparation de phases, la mouillabilité, la formation de mousses, la solubilisation, l'inhibition de la corrosion, la diminution de la viscosité. En outre, ils possèdent des propriétés antimicrobiennes, antitumeur et antimycoplasique (figure 1.16). Ils peuvent être utilisés dans de nombreux domaines [48].

Tableau 1.2 résume les différents domaines d'application des biosurfactants [5].

Fonction	Champ d'application
Emulsifiant et dispersant	Cosmétique, peinture, produit alimentaire

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

On peut utiliser les biosurfactants dans l'industrie alimentaire comme ingrédients de la formulation des aliments ainsi agents anti adhésifs, on peut les utiliser aussi dans les transformations des aliments comme citer ci-dessous.

### 1.7.1. Ingrédients de la formulation des aliments

En plus de leur rôle évident comme agents qui diminuent la tension superficielle et interfaciale, en favorisant la formation et la stabilisation des émulsions, des agents tensioactifs microbiens peuvent avoir plusieurs fonctions en d'autres produits alimentaires. Par exemple pour contrôler l'agglomération des globules gras, de stabiliser les systèmes gazeux, d'améliorer la texture et la durée de conservation des produits contenant de l'amidon, de modifier les propriétés rhéologiques de la pâte de blé et d'améliorer la consistance et la texture des produits à base de graisse [52]. Van Haesendonck *et al.* [60] suggèrent également l'utilisation de rhamnolipides pour améliorer les propriétés de la crème au beurre, les croissants et des produits de confiserie congelés. L-rhamnose a un potentiel considérable en tant que précurseur pour les arômes, il est déjà utilisé industriellement comme précurseur de composants aromatiques de haute qualité comme Furanéol (marque de Firmenich SA, Genève). L-rhamnose est obtenu par l'hydrolyse du rhamnolipide produit par *Pseudomonas aeruginosa* [61].

Dans la boulangerie et les formulations de la crème glacée, les biosurfactants agissent pour le contrôle de cohérence, ce qui retarde le rancissement et la solubilisation des huiles aromatiques; ils sont également utilisés en tant que stabilisants de la graisse et agent anti-projection lors de la cuisson de l'huile et des graisses [62]. Une amélioration de la stabilité de la pâte, de la texture, du volume et la conservation des produits de boulangerie est obtenue par l'addition des rhamnolipides [63].

Un bio-émulsifiant isolé à partir d'une souche marine d'*Enterobacter cloacae* a été décrit comme un améliorant de la viscosité, c'est un agent d'intérêt dans l'industrie alimentaire, en particulier en raison de la bonne viscosité observée à un pH acide qui permet son utilisation dans des produits contenant l'acide citrique ou de l'acide ascorbique [64].

### **1.7.2. Agents antiadhésifs**

Un biosurfactant produit par *Streptococcus thermophilus* a été utilisé pour le contrôle de l'encrassement des plaques d'échangeurs de chaleur dans les pasteurisateurs car il retarde la colonisation d'autres souches de *Streptococcus* thermophiles responsables de l'encrassement [65]. Dernièrement, le biosurfactant produit par *Lactobacillus fermentum* a été signalé pour inhiber l'infection à *Staphylococcus aureus* et le respect pour les implants chirurgicaux [66].

L'utilisation de biosurfactants produits par les souches de lactobacilles est très prometteuse une fois que ces micro-organismes naturellement présents dans la flore humaine et ont également un effet probiotique [67]. Beaucoup plus de recherches sont nécessaires pour comprendre l'apport de ces biosurfactants dans la prévention de la colonisation des agents pathogènes, les aspects biochimiques de la biosynthèse et leur caractérisation structurale.

La Surfactine a diminué la quantité de la formation de biofilms par *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *E. coli* et *Proteus mirabilis* dans des plaques de PVC [68].

### **1.7.3. Agents émulsifiants**

Une émulsion est un système hétérogène, constituée d'au moins un liquide immiscible intimement dispersé dans un autre sous la forme de gouttelettes, dont le diamètre dépasse en général 0,1 mm. De tels systèmes possèdent une stabilité minimale, qui peut être accentuée par des additifs tels que des agents tensio-actifs. Ainsi, des émulsions stables peuvent être produites avec une durée de vie des mois et des années [69]. La compréhension de la formation, des structures et propriétés des émulsions est essentielle pour la création et la stabilisation de structures dans les aliments.

Selon IRIE *et al.* [68] l'utilisation d'agents tensioactifs biologiques en combinaison avec des antibiotiques pourrait représenter une nouvelle stratégie antimicrobienne une fois que les antibiotiques sont en général moins efficaces contre les biofilms.

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

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

Des gouttelettes d'huile sont mises en suspension dans une phase aqueuse continue. C'est le type le plus polyvalent des émulsions, qui sont pratiquées sous de nombreuses formes (mayonnaises, garnitures fouettables, mélanges de crèmes de glace) et de leurs propriétés sont contrôlés à la fois les agents tensioactifs utilisés et les composants présents dans la phase aqueuse.

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

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

Un lipopeptide obtenu à partir de *Bacillus subtilis* a été capable de former des émulsions stables avec l'huile de soja et de graisse de coco, ce qui suggère son potentiel en tant qu'agent émulsifiant dans les aliments [70].

Un manoprotéine de *Kluyveromyces marxianus* a été capable de former des émulsions avec l'huile de maïs qui ont été stables pendant trois mois; la levure a été cultivée sur un milieu à base de lactosérum suggérant une application potentielle comme un bioémulsifiant alimentaire [71]. Le composé riche en glucides extracellulaires de *Candida utilis* était utilisé avec succès comme agent émulsifiant dans les formulations de vinaigrette [72].

## 1.8 Avantages des biosurfactants

Les biosurfactants ont des plusieurs avantages :

- Bonne stabilité thermique et chimique : pH (2 à 10), salinité (jusqu'à 20 %), et de température (jusqu'à 100°C).
- Biocompatibilité et digestibilité : application dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels.
- Caractéristiques écologiques : biodégradables et non toxiques.
- Temps de stockage long.
- Production à partir des déchets industriels (substrats effluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du cout de production.

L'utilisation des biosurfactants, dans tous les domaines et notamment leurs applications environnementales, s'avère indispensable à cause des avantages cités précédemment. En effet, plusieurs facteurs influencent la nature et la quantité de la production des biosurfactants entre autres, le type de microorganisme et la source du carbone, cette dernière peut diminuer considérablement le coût de production qui est le seul inconvénient. Il est estimé que les matières premières représentent 10 à 30% du coût total de production dans la plupart des procédés biotechnologiques. Ainsi pour réduire ce coût, il est préférable d'utiliser les résidus (sous-produits) notamment de l'agroalimentaire en tant que substrat pour la production de biosurfactants. Finalement, une application efficace de biosurfactants, dans la bioremédiation des sites contaminés par les composés pétroliers, nécessitera un ciblage précis de la nature physico-chimique des polluants et des zones touchées [48].

# **Chapitre 02**

## **Partie expérimentale**

**Le déroulement de notre étude a eu lieu au niveau de cinq laboratoires a savoir :**

- Laboratoire de microbiologie et biochimie pavillon 22.
- Laboratoire d'analyse fonctionnelle pavillon 22.
- Laboratoire d'analyse numérique pavillon 22.
- Laboratoire de chimie des substances naturelles et biomolécules pavillon 8.
- Laboratoire d'hygiène de wilaya de Blida.

L'objectif principale de cette étude est la production de biosurfactant a partir de la souche bactérienne *Bacillus amylolequifaciens* en suite l'application de ce dernier dans une sauce vinaigrette.

Dans cette partie nous allons présenter :

- Les différentes étapes de production biosurfactant.
- L'application de ce biosurfactant dans la sauce vinaigrette.
- Les déférents protocoles expérimentaux utilisés.

## 2.1 Produits et matériels utilisés

### 2.1.1 Produits utilisés

- Peptone.
- L'extrait de levure.
- Chlorure de sodium NaCl.
- Hydroxyde de sodium NaOH.
- Acide chlorhydrique HCl.
- Nitrate de sodium NaNO<sub>3</sub>.
- Hydrogénophosphate de potassium K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- Phosphate de potassium KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Chlorure de magnésium MgCl<sub>2</sub>.
- Chlorure de calcium CaCl<sub>2</sub>.
- Hexane C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>.
- Dichlorométhane CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.
- HEC.
- Lécithine de soja.
- L'agar.

### 2.1.2 Matériels utilisés

Tableaux 2.1 : matériels utilisés

Petit matériel	Appareillage
Verrerie de laboratoire : béchers, entonnoirs, erlenmeyers, éprouvettes, fioles jaugées, pipettes, pissettes, tubes à essai, verre de montre... -Thermomètre. -Papier filtre. -Boite pétri. -Lance en platine.	-Agitateur magnétique chauffant de marque IKA®RH-KT\C -Balance de précision. -pH mètre de marque inoLab. -Incubateur de marque memmert. -Autoclave de marque AUSCULAP. -Shiker de marque WiseCube. -Centrifugeuse de marque SIGMA.

<ul style="list-style-type: none"> <li>-Flacons.</li> <li>-Pipette pasteur.</li> <li>-Ampoule à décanté.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Etuve de marque mLw.</li> <li>-Rotavapeur de marque BUCHI.</li> <li>-Homogénéisateur de marque IKA® digital ULTRA DURRAX.</li> <li>-Rhéomètre de marque MCR 302.</li> <li>-Refrégérateur de marque CONDOR.</li> <li>-Hotte chimique.</li> </ul>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 2.2 la souche bactérienne utilisée

### 2.2.1 Définition

La souche bactérienne que nous avons utilisé pour produire notre biosurfactant est appelée *Bacillus amylolequifaciens*, cette dernière est une bactérie du sol, gram positive, catalase positive, aérobie, en forme de batonnet et mobile. Elle forme une endospore forte lorsque les conditions ne sont pas favorables. Les spores sont dispersées dans la poussière, qui pénètre ensuite dans les réserves d'eau des plantes et des animaux. Le nom indique que ce bacille liquéfie l'amidon. La bactérie est également une source de subtilisine, qui est une protéase, cette enzyme est utilisée dans les détergents à lessive et les nettoyeurs pour lentille de contact. Aussi elle est une bactérie productrice des biosurfactants qui utilisés dans des nombreux domaine tel que : agroalimentaire, pharmaceutique, cosmétique, peinture.... [81]

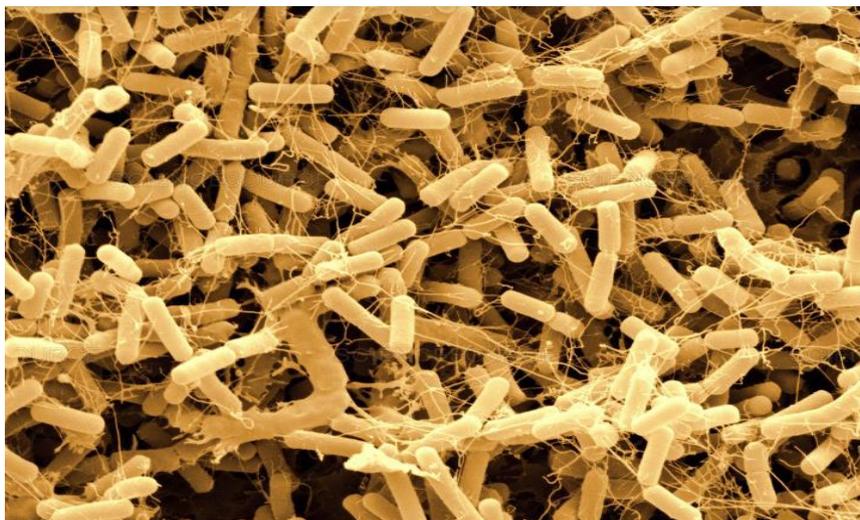


Figure 2.1 la bactérie *bacillus amylolequifaciens* sous microscope [81]

### 2.2.2 Origine de la souche bactérienne utilisée

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

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

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

La figure 2.2 montre le biotope utilisé pour l'isolement des souches bactériennes à potentiel de production de biosurfactant.

Figure 2.2 sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud) (EDDOUAOUDA, 2012)



Figure 2.2 sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud) ( EDOUAOUDA , 2012)

### 2.3 Criblage des souches productrices de biosurfactant

#### ➤ Repiquage :

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

Le repiquage est réalisé sur milieu LB solide. Après l'incubation à 45 °C pendant 24 h, les souches sont conservées à 4 °C pour une durée de 4 à 6 semaines afin de pouvoir toujours disposer des souches viables [87].

➤ **Préparation de culture fraîche (milieu LB) :**

Le milieu de culture riche utilisé est le milieu Luria-Bertani (LB) dont la composition par litre d'eau distillée est la suivante : 5 g d'extrait de levure, 10 g de peptone et 23 g de NaCl, avec un pH égal à 7,4 et cela en utilisant une solution de (NaOH 0,1N) goutte à goutte. Ensuite on conditionne le milieu préparé dans des tubes à essai, dans chaque tube on met 4 ml de milieu LB, après l'autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

➤ **Préparation de la préculture bactérienne :**

Les souches conservées à 4 °C ont étéensemencées sur milieu liquide LB et puis incubées à 45°C pendant 18 h pour avoir un bon trouble de croissance. Ces dernières cultures ont servi à inoculer les milieux qui seront employés pour suivre la production des biosurfactants.

## **2.4 Production des biosurfactants**

Nous avons choisi la souche bactérienne *Bacillus amyloliquefaciens* pour la production de biosurfactant, et également étudier application en agroalimentaire.

➤ **Les condition de production sont :**

- Milieu de culture : milieu minimum MM.
- Source de carbone : l'huile d'olive.
- Température d'incubation est fixé à 45°C.
- Temps d'incubation est 48 heures.
- pH = 7.0
- Agitation est de 150 tr/min.

➤ **Préparation de milieu de production (milieu minimum MM) :**

Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, milieu minimum (MM), sa composition (g/l d'eau distillée) est : NaNO<sub>3</sub> (0,4), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,3), NaCl (10), MgCl<sub>2</sub> (0,3), CaCl<sub>2</sub> (0,05), extrait de levure (1) et quelque gouttes de solution des éléments minéraux qui contenant (par litre): [H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> (0,25g), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,5g), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (0,5g),

NaMoO<sub>4</sub> (0,06g), ZnSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (0,7g)]. Le pH est ajusté entre 7,1±0,2. Ensuite, le milieu est stérilisé à 121 °C pendant 20 min.

On prépare 3 litres de milieu minimum (MM) et on diviser-les à des flacons de 250 ml, on met dans chaque flacon un volume de 50 ml de MM en suite nous y ajoutons l'huile d'olive qui est la source de carbone à volume de 1 %, et la suspension bactérienne à volume de 1 % et quelques gouttes de solution des éléments minéraux. Puis on les met dans le schiker (de marque WiseCube) pendant 48 heures à 150 tr/min.

#### ➤ **Extraction de biosurfactant :**

L'extraction du biosurfactant est généralement utilisée pour enlever les composés hydrophiles. Les solvants individuels ou mixtes employés sont : acétate d'éthyle (v/v), chloroforme/méthanol (2/1), dichlorométhane (v/v), et l'acétone (v/v) [88].

La procédure de récupération de biosurfactant est la suivante : lorsque l'activité de biosurfactant est maximale dans le surnageant (détecté par le test de déplacement de pétrole), le bouillon de culture a été centrifugé à 4500 tr/min pendant 20 min afin d'éliminer la biomasse. Le surnageant correspond à la présence du biosurfactant brut. Un traitement à l'aide de l'hexane pour éliminer les acides gras, ensuite avec le dichlorométhane. Le solvant a été ensuite enlevé à l'aide d'un rotavapeur (de marque BUCHI).

## **2.5 Essai d'application de biosurfactant dans le domaine agroalimentaire**

Vu les propriétés émulsifiantes intéressantes de notre biosurfactant produit par la souche *Bacillus amyloliquifaciens*, nous avons développé une nouvelle formule de la sauce vinaigrette avec des caractéristiques similaires à la vinaigrette commerciale.

La vinaigrette représente une émulsion de type directe, complexe, finement dispersée, stable et grasse.

Les différentes formulations de la vinaigrette se distinguent principalement par la composition, le type du stabilisateur et de l'émulsifiant [89].

Sur cette optique nous avons procédé à la préparation d'une sauce vinaigrette à partir de trois substrats à titre d'agents émulsifiants (ces trois ingrédients sont les plus critiques pour la stabilité de la vinaigrette) : SIN1422 c'est un épaississant alimentaire, la lécythine de soja, et le biosurfactant issu de la souche *Bacillus amyloliquifaciens*.

Parmi nos objectifs est que notre produit fini soit avant tout stable du point de vue rhéologique et microbiologique tout au long de la période de stockage. Ainsi l'obtention de bonnes propriétés sensorielles par rapport au produit de référence.

## **2.5.1 La technologie de la préparation des échantillons de la sauce vinaigrette**

### **2.5.1.1 Préparation des échantillons**

Pour cette présente étude, nous avons préparé trois (03) échantillons de la sauce vinaigrette qui diffèrent par leur contenance en agent émulsifiant : la lécithine de soja, le biosurfactant, et un 3<sup>ième</sup> échantillon a été pris comme référence « la sauce vinaigrette commerciale de marque Daily.

Echantillon 1 : vinaigre, moutarde, HEC, sel et la lécithine de soja (avec des différentes concentrations).

Echantillon 2 : vinaigre, moutarde, HEC, sel et le biosurfactant (avec des différentes concentrations).

Echantillon 3 : vinaigrette commerciale Daily.

Les ingrédients de la sauce vinaigrette Daily sont : eau, l'huile de colza 16%, vinaigre, sucre, moutarde, sel, épaississant : SIN1422, stabilisant : gamme xanthane, régulateur d'acidité, acide tartrique, colorant, arômes, et antioxydant.

Les ingrédients ajoutés dans nos échantillons sont : le vinaigre blanc (CASBAH), sel (ENASEL), huile végétale (CEVITAL), moutarde (SIDNA).

### **2.5.1.2 Préparation de la phase aqueuse**

- On effectue un pesage initial de toutes les matières premières requises pour chaque essai.
- Les ingrédients secs tels que le sel, la moutarde, On laisse la dispersion sous agitation pendant un certain temps pour que les ingrédients s'hydratent et se dispersent finement.

### **2.5.1.3 Préparation de la phase huileuse**

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

### 2.5.1.4 Préparation de l'émulsion

On verse lentement la phase huileuse dans la phase aqueuse, sous une forte agitation en utilisant un appareil agitateur (ULTRA DURAX IKA T25), pour assurer une bonne émulsification de la préparation. Le mélange devient opaque et homogène, à la fin on ajoute le vinaigre.

Après les 4 étapes de la préparation, les échantillons de la sauce vinaigrette obtenus ont été placés dans des tubes à essai en verre fermés et stériles, et maintenus pendant 48h à une température de 4 °C avant l'analyse.

Tableau 2.2 représente la quantité des ingrédients que nous avons utilisé pour la sauce vinaigrette étudié pour 100 g.

Les ingrédients	La quantité (g)
Le sel	1
HEC	0.2
Moutarde	5
Huile (90% l'huile végétale + 10% l'huile d'olive)	279
Vinaigre	93

**NB** : nous avons utilisé différentes concentrations des émulsifiants quel que soit le biosurfactant ou la lécithine de soja afin de connaître la concentration optimale qui maintient la stabilité de vinaigrette tout au long de la période de travail.

Tableau 2.3 représente les différentes concentrations de biosurfactant et la lécithine de soja.

Biosurfactant	0.10 (g/l)	0.12 (g/l)	0.14 (g/l)	0.16 (g/l)	0.18 (g/l)
Lécithine de soja	0.14 (g/l)	0.15 (g/l)	0.16 (g/l)	0.17 (g/l)	0.18 (g/l)

## 2.6 La caractérisation rhéologique des échantillons de la sauce vinaigrette

Dans cette partie, nous proposons de caractériser le comportement rhéologique d'un produit de référence « vinaigrette de marque Daily » ainsi que les essais formulés.

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

Les mesures rhéologiques sont réalisées à l'aide d'un rhéomètre de marque MODULAR COMPACT RHEOMETER.

L'intervalle de variation de la vitesse de déplacement est de 0,01 à 1000  $s^{-1}$ , à une température de 22 °C, avant et après l'effet mécanique.

L'analyse statistique des données obtenues a été réalisée en utilisant le logiciel STATISTICA. Autre caractéristique est la stabilité de l'émulsion à la centrifugation, cette méthode consiste à soumettre l'émulsion à une centrifugation afin de vérifier la non-séparation des phases de l'émulsion.

## **2.7 Contrôle bactériologique [90]**

Le contrôle bactériologique permet de dénombrer les microorganismes dans les produits alimentaires destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

### **2.7.1 Principe**

C'est un ensemencement en profondeur d'une gélose définie et coulée dans des boîtes de pétri contenant des quantités déterminées de l'échantillon. Après incubation, procéder au comptage des colonies apparues dans le milieu et au calcul du nombre des germes aérobies mésophiles par gr ou ml d'échantillon.

### **2.7.2 Technique de dilution successive**

En milieu aseptique, un millilitre de la suspension mère est prélevé avec une pipette graduée, et transversé dans un tube contenant 9 ml de diluant TSE (eau physiologique) afin de réaliser une dilution au 1/100 pour les produits solides et au 1/10 pour les produits liquides. L'opération est renouvelée en changeant de pipette et en versant de nouveau 1 ml dans un nouveau tube de TSE, et ainsi de suite, jusqu'à ce que la concentration des bactéries devienne relativement faible. Les tubes sont homogénéisés entre chaque dilution et afin d'avoir une égalité statique entre les tubes, un millilitre de la dernière solution est jeté.

### 2.7.3 Mise en gélose

On prend une nouvelle pipette et à partir de la dernière dilution, on prélève 1 ml de dilution qui sera réparti en goutte au fond de la boîte correspondante. L'opération est renouvelée pour la seconde boîte. On remonte jusqu'à la dilution supérieure sans changer de pipette, jusqu'à la première dilution. Les gouttes sont ensuite recouvertes d'une couche de gélose PCA en surfusion, et le tout est homogénéisé avec des mouvements circulaires. On s'arrange pour que la gélose ne soit pas trop chaude de façon à ne pas tuer les bactéries. Une fois la gélose refroidie, on la passe une seconde couche de gélose blanche ou PCA, ce qui a pour effet d'immobiliser les bactéries, et donc de former des colonies définies. On met à incuber à 30°C pendant 72h. On effectue des lectures chaque 24h.

### 2.7.4 Lecture

On dénombre les colonies qui poussent en profondeur, puis on note les dilutions correspondantes. On effectue des lectures chaque 24h. Il est impossible de compter une boîte contenant plus de 300 colonies en raison d'un risque d'erreur trop important. Ces résultats sont donc rejetés. Les boîtes contenant moins de 30 colonies sont elles aussi écartées, les colonies sont trop rares et peuvent induire en erreur.

### 2.7.5 calcul

On utilise la formule mathématique suivante.

$$N = \frac{\sum c}{V_{ml} * (n_1 + 0.1n_2) * d_1}$$

Retenir 2 dilutions successives (plus fortes dilutions) où le nombre de colonies dénombrées soit compris :  $30 \leq c \leq 300$ .

- N : nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial ;
- $\sum c$  : sommes des colonies des boîtes interprétables ;
- $V_{ml}$  : volume de solution déposé (1 ml) ;
- $n_1$  : nombre de boîtes considérées à la première dilution retenue ;
- $n_2$  : nombre de boîtes considérées à la seconde dilution retenue ;
- $d_1$  : facteur de la première dilution retenue ;

## **2.8 Stabilité physico-chimique**

La stabilité physico-chimique est contrôler les paramètres physico-chimiques de la sauce vinaigrette tel que : le pH et la température.

# **Chapitre 03**

## **Résultats et discussions**

### 3.1 Production de biosurfactant

La production de biosurfactant par des microorganismes mésophiles a été largement étudiés. En revanche, peu de travaux ont été réalisés à des températures supérieures à 40°C. Ceci montre l'importance des souches thermophile utilisée dans notre cas d'étude.

Le tableau suivant représente toutes les étapes de la production de biosurfactant.

Tableau 3.1 représente les étapes de la production des biosurfactant.

L'étape	Image
<b>Préparation de milieu LB</b>	
<b>Préparation de milieu MM</b>	
<b>Incubation 150tr/mn pendant 48h</b>	
<b>Centrifugation 4000 tr/mn pendant 20 mn</b>	

<p><b>Filtration par papier filtre</b></p>	
<p><b>Filtration par l'hexane</b></p>	
<p><b>Décantation par dichlorométhane</b></p>	
<p><b>Extraction de biosurfactant</b></p>	

La période de production de biosurfactant a réaliser pendant 2 mois, nous avons répété ces étapes chaque semaine par ce que la quantité que nous avons obtenue ne dépasse pas 0.4 gr.

La quantité finale égale 2 grammes.



Figure 3.1 biosurfactant extrait par la souche *Bacillus amyloliquifaciens*

### 3.2 Essai d'application en agroalimentaire dans la préparation de la sauce vinaigrette

Les analyses physico-chimiques, organoleptiques et sensorielles ont été réalisées sur les 03 échantillons de la sauce vinaigrette. Ces analyses permettront d'apprécier la qualité des produits.

#### 3.2.1 Test de séparation de la vinaigrette de lécithine de soja

Les résultats que nous avons obtenus après 48h montre que la concentration optimale de lécithine de soja est 0.16g/l pour la stabilisation (non-séparation) des phases de la vinaigrette.

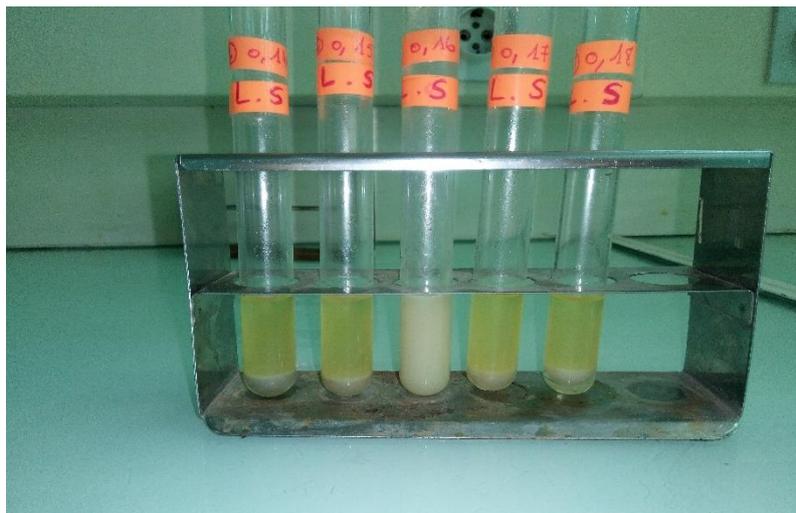


Figure 3.2 vinaigrette de lécithine de soja.

### 3.2.2 Test de séparation de la vinaigrette de biosurfactant

Les résultats que nous avons obtenus après 48h montre que la concentration optimale de biosurfactant est 0.10g/l pour la stabilisation (non-séparation) des phases de la vinaigrette.

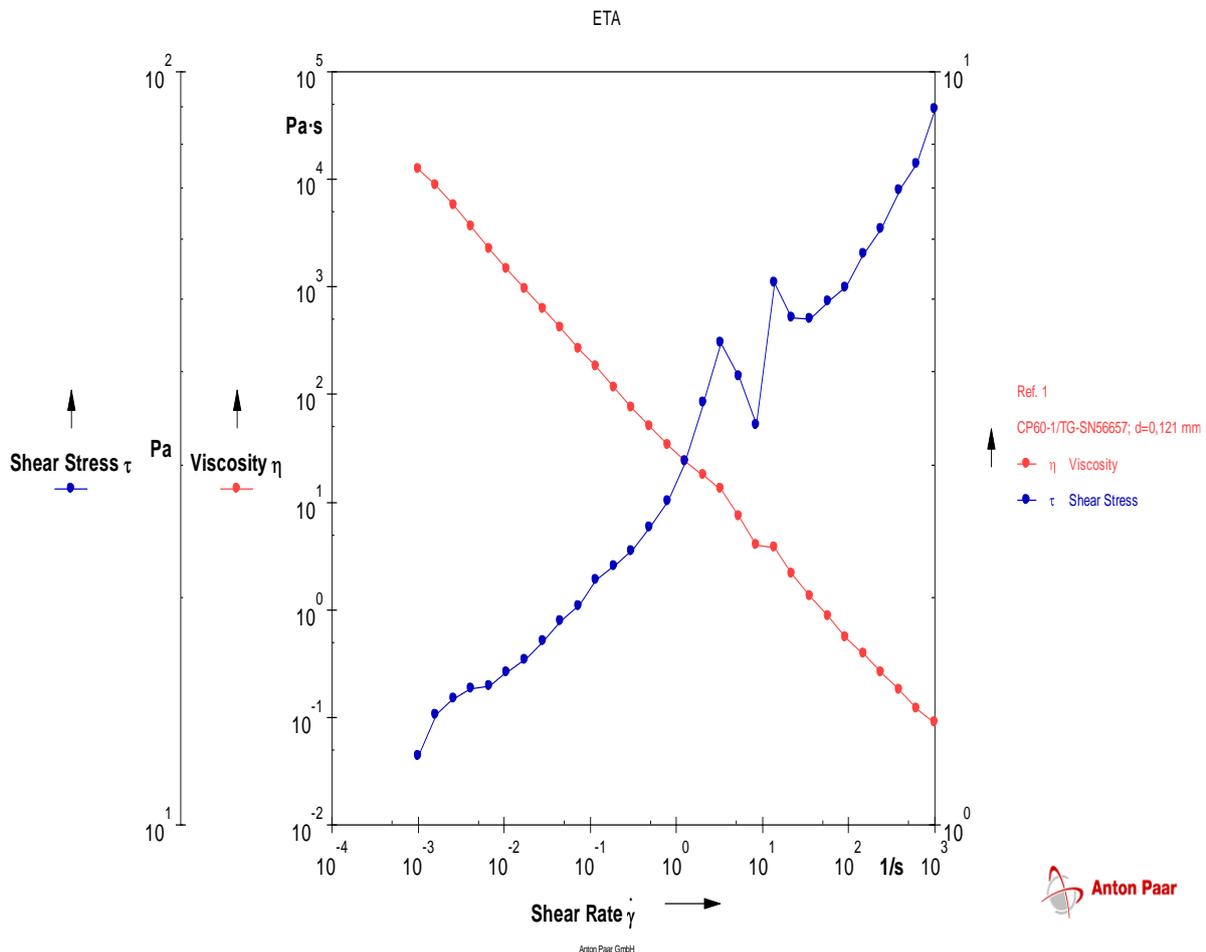


Figure 3.3 vinaigrette de biosurfactant

Ces résultats montre que nous pouvons utiliser le biosurfactant comme agent émulsifiant dans la préparation de sauce vinaigrette et à faible concentration (0.10g/l) par rapport au lécithine de soja (0.16g/l).

### 3.3 La caractérisation rhéologique des échantillons de la sauce vinaigrette

Les résultats des caractéristiques rhéologiques étudiées sont présentés dans la Figure 3.4 :





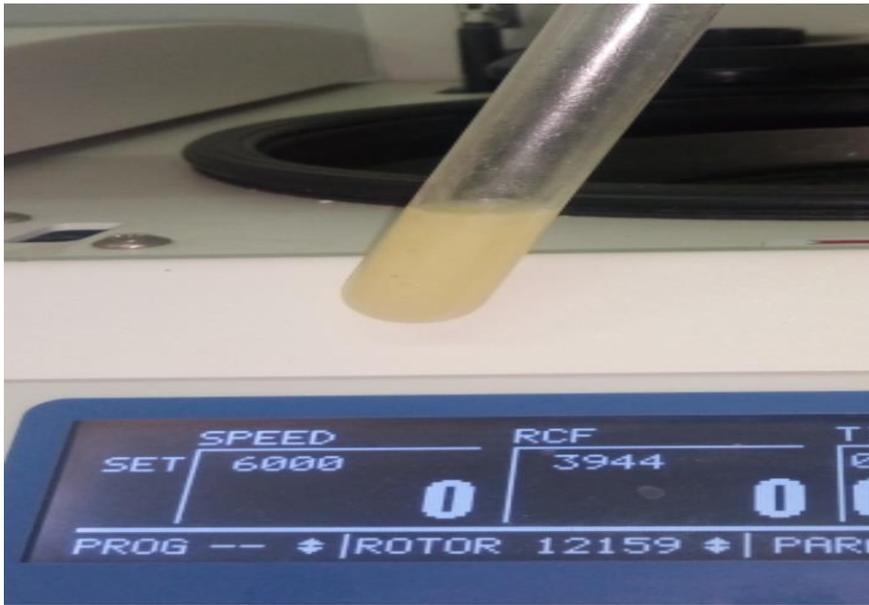


Figure 3.7 : centrifugation de vinaigrette qui contient le biosurfactant.

### 3.5 Contrôle bactériologique

Cette étape a été réalisée au laboratoire d'Hygiène de Blida, les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3.8



Figure 3.8 : dénombrement des microorganismes de vinaigrette qui contient le biosurfactant

Tous les résultats de lecture sont résumés au tableau 3.2

Tableau 3.2 représente les résultats de dénombrement des microorganismes de la vinaigrette qui contient le biosurfactant comme agent émulsifiant.

Dilution	Boite de pétri	Résultat de comptage	Boîtes retenus
$10^{-1}$	Boite n°1	0	<b>X</b>
$10^{-1}$	Boite n°2	0	<b>X</b>
$10^{-2}$	Boite n°1	0	<b>X</b>
$10^{-2}$	Boite n°2	0	<b>X</b>
$10^{-3}$	Boite n°1	3	<b>X</b>
$10^{-3}$	Boite n°2	0	<b>X</b>

Selon le journal officiel de la république algérienne N°39 la formule de dénombrement des microorganismes est valable si le nombre des colonies est entre 15 et 150 colonies.

Nous avons trouvé 3 colonies seulement dans notre cas, donc on ne peut pas appliquer cette formule, et ce qui montre que notre vinaigrette qui contient le biosurfactant comme agent émulsifiant est de bonne qualité.

### **3.6 Vue microscopique de vinaigrette**

Cette étape a été réalisée à l'aide d'un microscope optique.

La figure ci-dessus représente la vue microscopique de vinaigrette qui contient le biosurfactant avec un agrandissement de 40X.

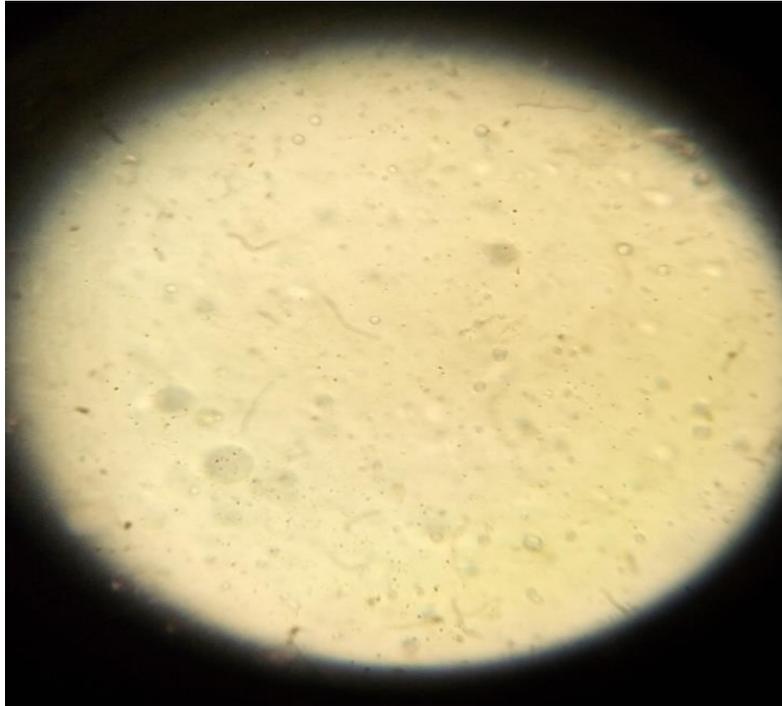


Figure 3.9 : vue microscopique de la vinaigrette qui contient le biosurfactant

### **3.7 Stabilité physico-chimique**

#### **3.7.1 Mesure de température**

La température a été mesurée à l'aide d'un thermomètre au mois de juillet, c'est un mois très chaud.

Les résultats obtenus ont montré dans la figure 3.9 :

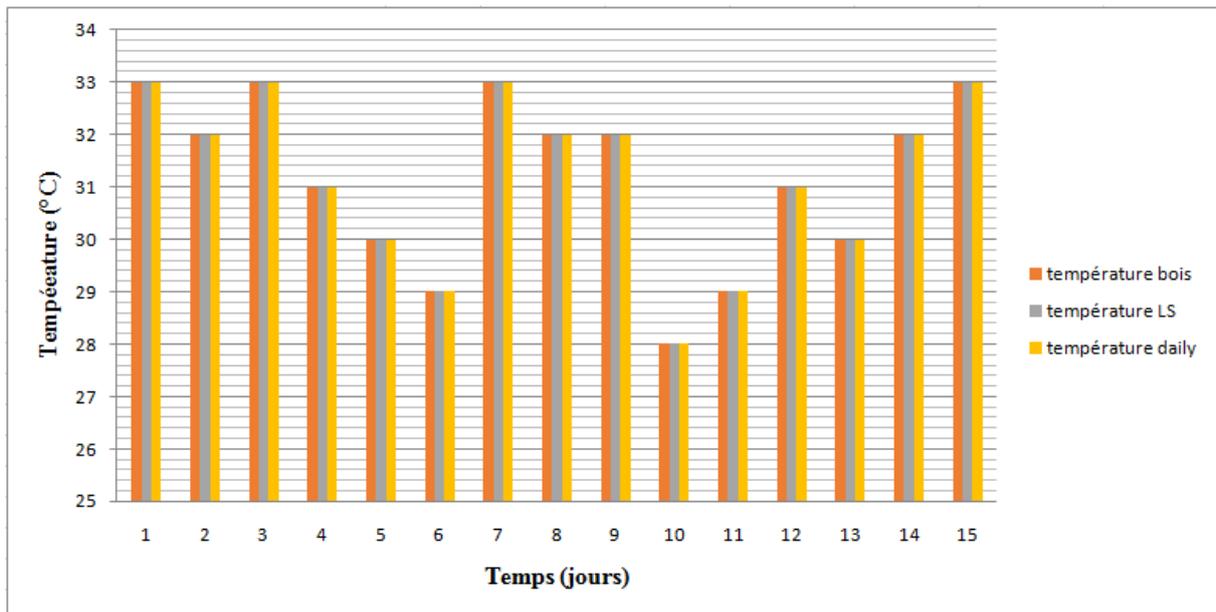


Figure 3.10 : l'évolution de température en fonction de temps

Nous remarquons que les 3 échantillons de la vinaigrette possèdent la même température tout au long la période de travail.

Ces résultats montrent que le biosurfactant produit est considéré comme d'excellent produit thermostable, ce qui favorise leur utilisation dans l'industrie agroalimentaire et sous différentes conditions de température.

### 3.7.2 Mesure de pH :

La mesure de pH a réalisé à l'aide d'un papier pH.



Figure 3.11 papier pH

Les résultats obtenus sont montrés dans les histogrammes suivants :

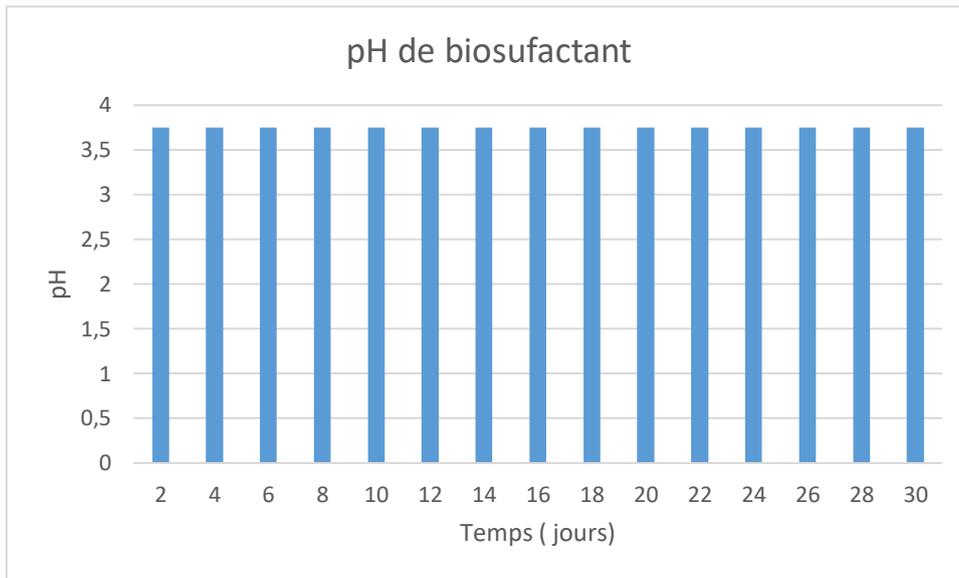


Figure 3.12 la variation de pH de biosurfactant en fonction de temps

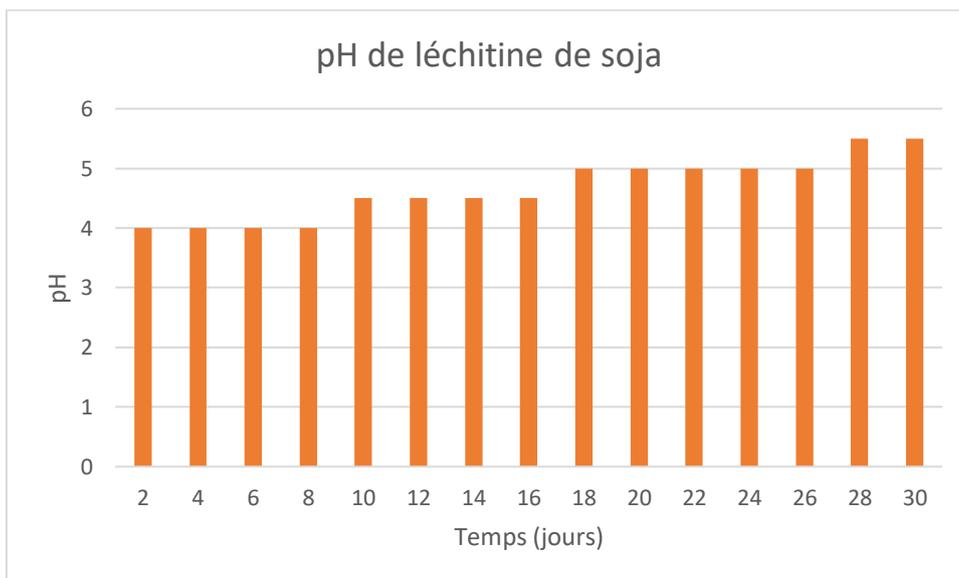


Figure 3.13 la variation de pH de lécithine de soja en fonction de temps

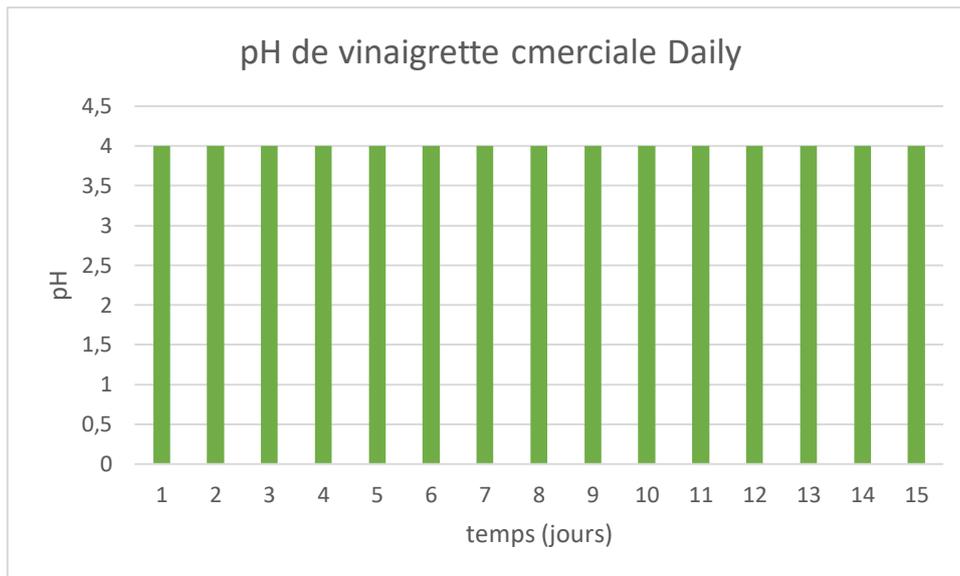


Figure 3.14 la variation de pH de vinaigrette commerciale Daily en fonction de temps

Le pH de la vinaigrette peut avoir un effet dramatique sur l'effet de la structure de l'émulsion. Il est à noter que le pH relativement faible ( $\text{pH} < 4,3$ ) est un avantage du point de vue de la stabilité de la mayonnaise. Selon Maruyama *et al.* [80], la vinaigrette est stable à un pH allant de 3 à 5.

Les résultats obtenus montrent que la comparaison entre les trois échantillons indique que la valeur du pH de la vinaigrette commerciale Daily est élevée par rapport à la vinaigrette qui contient le biosurfactant. Après 30 jours de stockage, la vinaigrette commerciale a enregistré une stabilité du pH, ainsi que pour la vinaigrette qui contient le biosurfactant au période de stockage. Par contre la vinaigrette qui contient la lécithine de soja a enregistré une légère augmentation du pH pendant les 30 jours ( $\text{pH} > 5$ ). Ceci exige l'ajout de régulateur.

En conclusion, une application de biosurfactant issu de la souche bactérienne *bacillus amyloliquifaciens* en agroalimentaire a été réalisée par la préparation d'une vinaigrette, les résultats obtenus montrés la possibilité d'utiliser ce dernier comme émulsifiant. A cet effet, les microbiologiques, rhéologiques et physico-chimiques de la vinaigrette préparée par notre biosurfactant sont similaires aux caractéristiques de la sauce vinaigrette commerciale de marque Daily.

# **Conclusion générale**

# Conclusion générale

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

La première partie de l'étude s'est intéressée à la production biosurfactants. Une souche bactérienne *Bacillus amyloliquifaciens* thermophile (isolées à 45 °C) « dite performante » a été sélectionnée pour la production de biosurfactant.

Nous avons eu une très faible quantité de biosurfactant ne dépasse pas deux grammes pendant deux mois de production.

La seconde partie de l'étude nous a permis d'évaluer l'efficacité des biosurfactants, issus de la souche *Bacillus amyloliquifaciens*, en étudiant leurs applications en agroalimentaire. Les résultats obtenus ont montré que :

- La concentration optimale de biosurfactant dans la vinaigrette est 0.10 g/l pour la non-séparation des phases.
- La concentration optimale de la lécithine de soja dans la vinaigrette est 0.16 g/l pour la non-séparation des phases.
- Une stabilité thermique pour les trois échantillons de vinaigrette.
- Une stabilité de pH pour la vinaigrette commerciale et la vinaigrette qui contient le biosurfactant, par contre enregistre une légère augmentation pour la vinaigrette qui contient la lécithine de soja.
- Les phases de la vinaigrette qui contient le biosurfactant restent constantes aux centrifugations par contre la vinaigrette qui contient la lécithine de soja, elles sont séparées à centrifugation de 6000 tours pendant 10 min.

Finalement, les résultats obtenus ont montré la possibilité d'utiliser le biosurfactant comme émulsifiant, épaississant et stabilisateur. A cet effet, les propriétés physico-chimiques, microbiologiques et rhéologiques de la vinaigrette préparée par notre biosurfactant sont similaires aux caractéristiques de la vinaigrette industrielle de marque « Daily ».

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

- Utilisation d'autres analyses et techniques (analyse biochimique et structurales par LC-MS et RMN) pour identifier les biosurfactants produits par la souche *Bacillus amyloliquifaciens*.
- Elargir l'application de ce biosurfactant dans le domaine agroalimentaire comme émulsifiant et conservateur.
- Etablir un plan d'expérience pour la réalisation des applications possibles.

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

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Sobrinho, H.B.; Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Porto, A.L.F.; Sarubbo, L.A., "Biosurfactants: Classification, properties and environmental applications". *In Recent Developments in Biotechnology*, 1st ed.; Studium Press LLC: Houston, TX, USA, Volume 11,(2013),1–29.
2. Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R., "Microbial biosurfactants production, applications". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*87, (2010), 427–444.
3. Kapadia, S.G., Yagnik, B.N., "Current trend and potential for microbial biosurfactants". *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 4, (2013), 1–8.
4. Rosenberg E. and Ron E.Z., "High- and low-molecular-mass microbial surfactants", *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 52, (1999), 2154 – 162
5. Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS., "Potential commercial applications of microbial surfactants". *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, (2000), 495–508.
6. Desai JD, Banat IM., "Microbial production of surfactants and their commercial potential". *Microbiol Mol Biol Rev.* 61, (1997), 47–64.
7. Smyth TJP, Perfumo A, Marchant R, Banat IM., "Isolation and Analysis of Low Molecular Weight Microbial Glycolipids Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology". *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, (2010a), pp 3705–3723.
8. Smyth TJP, Perfumo A, McClean S, Marchant R, Banat IM., "Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. *In: Timmis KN (ed) Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*". *Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, (2010b), pp 3689–3704
9. Healy, M.G., Devine, C.M. et Murphy R., "Microbial production of biosurfactants. Resources, Conservation and Recycling", 18, (1996), 41-57
10. Bognolo G., "Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons Colloids and Surfaces". 152, (1999), 41-52.
11. Falatko D.F. and J.T. Novak. "Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons". *Water Environ. Res.* 64, (1992), 163-169.
12. Mulligan C.N., "Environmental application for biosurfactants", *Environmental Pollution*, 133, (2005), 183 - 198.

13. Bernheimer A. W. and Avigad L. S., "Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*". *Journal of General Microbiology*. 61, (1970), 361 - 369.
14. Moran A. C., Martinez M. A. and Sineriz F., "Quantification of Surfactin in Culture Supernatant by Hemolytic Activity". *Biotechnol Lett*. 24,(2002),177-80.
15. Johnson M. K. and Boese-Marrazzo D., "Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*". *Infect. Immun.* 29 (3), (1980),1028 - 1033.
16. Carrillo P. G., Mardaraz C.,Pitta-Alvarez S. J. and Giulietti A. M., "Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. J". *World Microbiol. Biotechnol.* 12,(1996), 82– 84.
17. Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N., Knapp R.M. and McInerney M.J., "Comparison of Methods to Detect Biosurfactant Production by Diverse Microorganisms", *Journal Microbiological Methods*. 56, (2004), 339 - 347.
18. Van Dyke, M.I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., and Trevors, J.T., "*Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactant: Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J". *Microbiol.* 39, (1993),1071 – 1078
19. Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, Garcia F & Manresa A., "Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes". *Langmuir*, 17, (2001), 1367–1371
20. Pacwa–Plociniczak, M.; Plaza, G.A.; Piotrowska–Seget, Z.; Cameotra, S.S., "Environmental applications of biosurfactants: Recent advances. Int. J. Mol". *Sci*, 13, (2011), 633–654.
21. Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, Gutnick DL., "Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties". *Appl Environ Microbiol*, 37, (1979), 402–408.
22. Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi and T. Imanaka., "A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. J". *Bacteriol*, 175, (1993), 6459-6466.
23. Mulligan C N, Yong R N, Gibbs B F., "Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil". *A review. Engineering Geology*, 60(1-4), ( 200),1371–380.
24. yakimov , M.M., Timmis , K.n., Wray V. and Fredrickson , H.L., "Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50". *Applied and Environmental Microbiology*, 61, (1995),1706-1713.

25. Amani H, Mehrnia MR, Sarrafzadeh MH, Haghghi M, Soudi MR. "Scale up and application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* in enhanced oil recovery". *Appl Biochem Biotechnol*,162, (20105),10–523.
26. Banat, I., "The isolation of a thermophilic biosurfactant-producing *Bacillus* species", *Biotechnology Letters*, 15, (1993), 591-594.
27. Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I. & Quesada, E. "*Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Ve´lez in Ma´laga, southern Spain". *Int J Syst Evol Microbiol*, 55, (2005), 191-195.
28. Sobrinho H.B.S., Rufino R.D., Luna J.M., Salgueiro A.A., Campos-Takaki G.M., Leite L.F.C., Sarubbo, L.A., "Utilization of two agro industrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995". *Process Biochemistry*, 43, (2008),912-917.
29. Seghal Kiran,G. Anto Thomas, T. & Selvin, J., "[Production of a new glycolipid biosurfactant from marine \*Nocardiopsis lucentensis\* MSA04 in solid-state cultivation.](#) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*", 78, (2010), 8-16.
30. Shin K-H, Kim K-W, Ahn Y., "Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization- biodegradation process. *J Hazard Mater*".137, (2006), 1831- 1837.
31. Bharali , S., Das , B.K., Konwar , A.J., "[Crude biosurfactant from thermophilic \*Alcaligenes faecalis\*: Feasibility in petro-spill bioremediation](#)". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 10, (2011), 01-19.
32. Ferhat samira, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Kamel Eddouaouda, Redha Alouaoui, Ahmed Boucherit, Najla Mhirib, Nadji Moulai-Mostefa, Sami Sayadi. "Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, (2011), pp.1182 – 88.
33. Ries, S.M. Strobel, G.A.. "Biological proprieties and pathological role of a phytotoxic glycolipeptide from culture of *Corynebacterium insidiosum* ". *Plant Pathol*, 2, (1972), 133-142
34. Pepi, M., Cesaro, A., Liut, G. & Baldi, F., "An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. Ant-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid". *FEMS Microbiology Ecology*, 53, (2004),157-166.

35. Arutchelvi, J. & Doble, M., "Characterization of glycolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* CPCL isolated from petroleum-contaminated soil". [\*Lett Appl Microbiol.\*](#)51, (2010), 75-82.
36. Laycock, M.V., Hildebrand, P.D., Thibault, P., Walter, J.A. Wright, J.L.C. "Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. J". *Agric. Food Chem*,39,(1991), 483-489.
37. Abu-Ruwaida A. S., Banat I. M., Haditirto and Khamis A., "Nutritional requirements and growth characteristics of a biosurfactant producing *Rhodococcus* Bacterium", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7, (1991), 53 - 61.
38. Urai, M., Aizawa, T., Anzai, H., Ogihara, J., Iwabuchi, N., Neilan, B., Couperwhite, I., Nakajima, M. & Sunairi, M., "Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by a benzenetolerant bacterium, *Rhodococcus* sp". 33. *Carbohydr Res*, 341, (2006), 616-623.
39. Shavandi, M., Mohebbali, G., Haddadi, A., Shakarami, H. & Nuhi, A., "Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6". *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, 82,(2011),477-482.
40. Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J. & Quesada, E., "Characteristics of bioemulsifiers synthesised in crude oil media by *Halomonas eurihalina* and their effectiveness in the isolation of bacteria able to grow in the presence of hydrocarbons". *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, (2002),347-351.
41. Eddouaouda kamal, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Sonia Ben Younes, Slim Cherif, Samira Ferhat, Najla Mhiri, Mohamed Chamkha1 and Sami Sayadi.. "Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites". *Journal of Basic Microbiology*, 51, pp. (2012) 1 – 11.
42. Seghal Kiran, G. Anto Thomas, T. Selvin, J. Sabarathnam, B. Lipton, A. P., "[Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine \*Brevibacterium aureum\* MSA13 in solid state culture](#)", VOL 101; NUMBER 7, (2011),pages 2389-2396
43. Salihu A, Abdulkadir I, Almustapha MN (2009) An investigation for potential development of biosurfactants. *Microbiol Mol Biol Rev* 3: 111-117.
44. Rahman PKSM, Gakpe E (2008) Production, characterization and application of Biosurfactants-Review. *Biotechnology* 7: 360-370.

45. Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 47- 64.
46. . Adamczak M, Bednarski W (2000) Influence of medium composition and aeration on the synthesis of biosurfactants produced by *Candida antarctica*. *Biotechnol Lett* 22: 313-316.
47. Zinjarde SS, Pant A (2002) Emulsifier from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol* 42: 67-73.
48. Eddouaouda kamal, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Sonia Ben Younes, Slim Cherif, Samira Ferhat, Najla Mhiri, Mohamed Chamkha1 and Sami Sayadi.. "Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites". *Journal of Basic Microbiology*, 51, pp. (2012) 1 – 11.
49. Mata-Sandoval J.C., Karns J. and Torrents A., "Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipides by *Pseudomonas aeruginosa* UG2", *Microbiol. Res.*, 155, (2000), 1 - 8.
50. Mata-Sandoval J.C., Karns J. and Torrents A., "Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipides by *Pseudomonas aeruginosa* UG2", *Microbiol. Res.*, 155, (2000), 1 - 8.
51. Cameotra SS, Makkar RS., "Synthesis of biosurfactants in extreme conditions". *Appl Microbiol Biotechnol*, 50, (1998), 520–529
52. Lang S, Wullbrandt D., " Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential". *Applied Microbiol Biotechnol*, 51(1),1999,22-32.
53. Robert M., Mercade M.E., Bosch M.P., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M.A. and Guinea J., "Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T", *Biotechnology Letters*, 11, (1989), 871 - 874.
54. Hommel R.K.and Ratledge C., "Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules", In *N. Kosaric* (ed.), NewYork, N.Y,Dekker, Inc., , *Biosurfactants: production, properties, applications*. Marcel, (1993), 3 - 63.
55. Guerra-Santos L., Kappeli O. and Fiechter A., "Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors", *Applied Microbiology and Biotechnology* 24, (1986), 443– 448.
56. Guerra-Santos L.H., Kappeli, O. and Fiechter A., "*Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon sources" ,*Applied and Environmental Microbiology*, 48, (1984), 301-305

57. Cooper DG, Goldenberg BG. "Surface active agents from two *Bacillus* species". *Appl Environ Microbiol*;53, (1987)224-229.
58. Luna, J.M.; Rufino, R.D.; Sarubbo, L.A.; Rodrigues, L.R.M.; Teixeira, J.A.C.; Campos-Takaki, G.M., "Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995". *Curr. Microbiol*, 62, ( 2011), 1527–1534.
59. Ławniczak, L.; Marecik, R.; Chrzanowski, L. "Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation". *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 97,(2013), 2327–2339.
60. Van Haesendonck, I.P.H. and Vanzeveren, E.C.A. W.O. 2004=040984 (2004).
61. Linhardt, R.J., Bakhit, R., Daniels, L., Mayerl, F., and Pickenhagen, W., *Biotechnol. Bioeng*, 33,(1989) 365–368.
62. Kosaric, N. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4): (2001), 295–304.
63. Iyer, A., Mody, K., & Jha, B. "Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide". *Enzyme and Microbial Technology*,38, (2006), 220-222.
64. Hood, S.K. and Zottola, E.A., *Food Control*, 6(1), (1995), 9–18.
65. Gan, B. S., Kim, J., Reid, G., Cadieux, P., & Howard, J. C., "*Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats". *Journal of Infectious Diseases*, 185(9), (2002),1369-1372.
66. Singh, P., & Cameotra, S. S., "Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences". *Trends in Biotechnology*, 22(3), (2004), 142-146.
67. Mireles II, J. P., Toguchi, A., & Harshey, R. M., "*Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation". *Journal of Bacteriology*, 183(20), (2001), 5848-5854.
68. Irie, Y., O'Toole, G. A., & Yuk, M. H., "*Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms". *FEMS Microbiology Letters*, 250, (2005), 237-243.
69. Rodrigues, L. R., Banat, I. M., van der Mei, H. C., Teixeira, J. A., & Oliveira, R., "Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants". *Journal of Applied Microbiology*, 100(3), (2006), 470-480.
70. Dagbert, C., Meylheuc, T., & Bellon-Fontaine, M. N., "Corrosion behavior of AISI 304 stainless steel in presence of a biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens*". *Electrochimica Acta*, 51, (2006).5221-5227.
71. Velikonja, J., & Kosaric, N. "Biosurfactants in food applications. In N. Kosaric (Ed.), New York: Marcel Dekker" , (1993), pp. 419-446.

72. Abe, M. and Scamehorn, J.F., "Mixed Surfactant Systems", 2nd edition; New York: Marcel Dekker" ,(2005).
73. Dickinson, E. and Euston, S.R., *Adv. Colloid Interface Sci*, 42, (1992), 89–148.
74. Deleu M, Paquot M., "From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants". *Comptes Rendus Chimie*, 7, (2004), 641–646.
75. Dubey, K., & Juwarkar, A., "Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 17, (2001),61-69.
76. Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Campos Takaki, G.M.; Sarubbo, L.A., "Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988". *Electron. J. Biotechnol*, 17, (2014), 34–38.
77. Rodrigues, L., Moldes, A., Teixeira, J., & Oliveira, R., "Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains". *Biochemical Engineering Journal*, 28, (2006),109-116.
78. Fox, S. L., & Bala, G. A., "Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates". *Bioresource Technology*, 75, (2000), 235-240.
79. Kukhar V., "Biomass - Feedstock for organic chemicals". *Kem Ind*, 58, (2009), 57–71
80. Savarino P, Montoneri E, Biasizzo M, Quagliotto P, Viscardi G, Boffa V., "Upgrading biomass wastes in chemical technology. Humic acid-like matter isolated from compost as chemical auxiliary for textile dyeing. J". *Chem Technol Biotechnol*, 82, (2007), 939–948
81. Santos, C.A.; Bezerra, M.S.; Pereira, H.S.; Santos, E.S.; Macedo, G.R., "Production and recovery of rhamnolipids using sugar cane molasses as carbon source. J". *Chem. Eng. Chem. Eng*, (2010), 4- 27.
82. Ponte Rocha M, Gomes Barreto R, Melo V, Barros Gonçalves L., "Evaluation of Cashew Apple Juice for Surfactin Production by *Bacillus subtilis* LAMI008". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 155, (2009), 63–7
83. Portilla-Rivera OM, Moldes Menduiña AB, Torrado Agrasar AM, Domínguez González JM., "Biosurfactants from grape marc: Stability study. J". *Biotechnol*, 131, (2007a), S136–S136.
84. Kukhar V., "Biomass - Feedstock for organic chemicals". *Kem Ind*, 58, (2009) 57–71.
85. Gupta R, Beg QK, Khan S, Chahuan B., "An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases". *Appl Microbiol Biotechnol*, 60, (2002), 381–395

86. Makkar RS, Cameotra SS., "Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. J". *Ind Microbiol Biotechnol*, 20, (1998), 48–52.
87. Joshi S, Bharucha C, Desai AJ., "Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B". *Bioresour Technol* ,99;(2008);4603-4608.
88. Mata-Sandoval J. C., and Torrents A., “High-performance liquid chromatography methods for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil”, *journal of Chromatography A*, 864, (1999), 211-220.
89. Fatma Zohra Ferradji, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Soumia Rebbani ,Djamila Fodil , Kamel Eddouaouda , Sami Sayadi., "Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces spp.* isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria) ". *International Biodeterioration & Biodegradation* 86, (2014), pp.300-308.
90. Azizi Djamel., “DENOMBREMENT DES MICROORGANISMES PAR COMPTAGE DES COLONIES A 30°C”. Institut Pasteur.
91. Das, P., Mukherjee, S., Sen, R., “Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin“. *Chemosphere*, 72, (2008) ,1229–1234.
92. Campos, J.M., Stamford, T.L.M., Sarubbo, L.A., Luna, J.M., Rufino, R.D.; Banat, I.M., “Microbial biosurfactants as additives for food industries“. *Biotechnol. Prog.* ,n°29, (2013),1097–1108.

# Annexes A

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

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

COT : Carbone Organique Total ;

N<sub>T</sub> : Azote total *Kjeldahl*,

HPT : Hydrocarbures Pétroliers Totaux .

- Sol non salin : CE<2
- Sol légèrement salin : 2<CE<3
- Sol salin : 3<CE<5
- Sol très salin : 9<CE<16
- Sol extrêmement salé 16<CE

# Annexe B

Composition de milieu LB (Luria Bertani) :

Le milieu de culture riche utilisé est le milieu Luria-Bertani (LB) dont la composition par litre est la suivante :

- 5 g extrait de levure.
- 10 g peptone.
- 23 g NaCl.