

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLAB-BLIDA

Faculté des Sciences Agronomiques, Vétérinaires et Biologiques

Département de Biologie

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de

MASTER

SPECIALITE : BIOLOGIE

OPTION : MICROBIOLOGIE ET TOXICOLOGIE ALIMENTAIRE

**PRODUCTION DE BIOSURFACTANT PAR UNE
SOUCHÉ BACTERIENNE THERMOPHILE
ISOLÉE LOCALEMENT EN VUE D'UNE
APPLICATION EN AGROALIMENTAIRE**

Par

Rahmani M'hamed

Soutenu le 03 Octobre Devant le jury composé de :

Président	Mme SAIDI F.	Professeur	(U.S.D.B)
Encadreur	Mr BADIS A.	Professeur	(U.S.D.B)
Examineur	Mr MOHAMED SAID R.	Maitre assistant classe A	(U.S.D.B)
Examineur	Mme KEBBAS S.	Maitre assistant classe A	(U.S.D.B)
Co-encadreur	Melle MESBAIAH F.Z.	Attachée de recherche	(C.N.R.D.P.A)

Année Universitaire 2012/2013

*D*édicace

*Je dédie mes écrits à celle qui a veillé sur moi depuis mon enfance,
Toi ma mère adorée.*

*A mon père qui à éclairé mon chemin, dans j'apprécie tellement
affection et son encouragement.*

A mes proches :

Mes frères : Nacre amine . Yazid rafik

Ma sœur : MAGUI

*A ma chère tante et son marié et ses
Enfants (Hadjer – Ouafaa et Med adem)*

A ma grande famille

Exceptionnellement à ma fiancée

Rahmani M'ahamed

العالمين لله رب الحمد

Remercîments

Un grand merci au Professeur **A. BADIS** de m'avoir accueilli au sein de son équipe et surtout de m'a confié un sujet si exaltant et à lui exprimer toute ma gratitude " toujours disponible, d'une gentillesse non mesurable, d'un dévouement inégalable et d'une patience remarquable".

*-Je remercie également **Mme F. SAIDI** Professeur à l'université Saad Dahlab de Blida qui m'a fait l'honneur de présider l'honorable jury.*

*- Je remercie, vivement et profondément les membres du jury qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce modeste travail, **MrR. MOHAMED SAID**, maître assistant classe A à l'université Saad Dahlab-Blida et **MmeS. KEBBAS**, maîtreassistante classe A à l'université Saad Dahlab-Blida.*

*- Je tiens à remercier vivement ma co-promotrice **MelleF.Z. MESBAIHAH**, d'avoir acceptée de diriger ce travail, pour son aide très précieuse, sa patience, sa compréhension, ainsi que ses conseils, recommandations et remarques constructives qui ont permis le bon déroulement des travaux.*

- J'adresse aussi mes remerciements à l'ensemble des enseignants, techniciens du département de chimie industrielle.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mes chers enseignants du département de biologie (USD – Blida) tout le secteur scolaires et universitaires, ainsi que toute personne ayant contribué à la réalisation de ce travail.

RESUME

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

Les résultats obtenus révèlent que : (a) La souche thermophile K7G a montré une forte capacité productrice de biosurfactant traduit par la réduction importante de la tension superficielle (32mN/m). (b) Le pétrole brut (1%, v/v) présente la meilleur source de carbone. (c) Le biosurfactant obtenu possède des propriétés tensioactives intéressantes; il est très stable thermiquement dans une large gamme de température [25 à 120°C], également, il présente une bonne résistance dans les milieux acide et basique [pH = 2 à 12]. (c) Une application de biosurfactant de la souche K7G a été réalisée en agroalimentaire par un essai de préparation de mayonnaise.

Mots clés: biosurfactant, bactérie, thermophile, agroalimentaire, émulsification

ABSTRACT

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

The results show that: (a) The thermophilic strain K7G showed strong biosurfactant producing capacity results in significant reduction of the surface tension (32mn / m). (b) Crude oil (1% v / v) represent the best carbon source. (c) Obtained biosurfactant has interesting surfactant properties and is very thermally stable in a wide temperature range [25-120 ° C], also, it has good resistance in acid and base medium [pH = 2-12]. (c) An application of the biosurfactant K7G strain was carried out in food by preparing mayonnaise.

Keywords: biosurfactant, bacteria, thermophilic, food, emulsification

المخلص

في هذا العمل قمنا بإجراء دراسة لإنتاج، توصيف والتطبيقي الصناعات الغذائية لمفاعل سطحي ناتج من سلالة محبة للحرارة المرتفعة المعزولة من ترربة رملية ملوثة بالهيدروكربونات البترولية (منطقة حاسي مسعود، جنوب الجزائر).

وتبين النتائج المحصل عليها: (أ) أظهرت السلالة المحبة للحرارة المرتفعة K7G إنتاجا قويا للمفاعل السطحي معبر عنه بدرجة كبيرة من التوتر السطحي (32mN/m). (ب) يمثل النفط الخام (1%) أفضل مصدر للكربون لعملية الإنتاج. (ج) أظهر المفاعل السطحي المنتج خصائص هامة مثل الاستقرار الحراري في نطاق واسع من درجة الحرارة [25-120 °م]، لديه مقاومة جيدة في الوسط الحمضي والقاعدي [الاس الهيدروجيني = 2-12]. (د) كما أعطى نتائج مرضية في إحدى مجالات الصناعات الغذائية في تجربة لتحضير المايونيز.

الكلمات المفتاحية: المفاعل السطحي - سلالة بكتيرية محبة للحرارة المرتفعة - الاستحلاب - الصناعات الغذائية

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	6
INTRODUCTION	8
CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
I.1. Tensioactifs	Erreur ! Signet non défini. 10
I.2. Mode d'action des tensioactifs.....	11
I.3. Propriétés pratiques des tensioactifs.....	11
I.4. Biosurfactants	12
I.4. Avantages des biosurfactants	12
I.5. Classification.....	12
I.6. Microorganismes producteurs des biosurfactants	13
I.7. Avantages des biosurfactants.....	15
I.8. Application de biosurfactants	15
I.9. Production de biosurfactants.....	16
I.10 Toxicité de biosurfactants.....	17
I.11 Les colloïdes alimentaires	18
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	20
II.1. Origine des souches bactériennes utilisées.....	20
II.2. Sélection des souches productrices de biosurfactants	20
II.3 Sources de carbone.....	22
II.4 Effet de la concentration de la source de carbone.....	22
II.5 Extraction de biosurfactants	22
II.6 Caractérisations de biosurfactant	23
II.6.1 Caractérisation structurale.....	23
II.6.2 Caractérisation physicochimique.....	23
II.7 Application de biosurfactant dans le domain agroalimentaire	24
CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	26
III.1 Origines des souches bactériennes	26
III.2 Etude de la production de biosurfactant	26
III.2.1 Effet de la source de carbone.....	27
III.2.2 Effet de la concentration de source de carbone	27
III.3 Récupération, caractérisation et application en agroalimentaire de biosurfactant issu d'une souche thermophile K7G.....	31
III.3.1 Extraction de biosurfactant	31

III.3.2 Caractérisation de biosurfactants	31
III.3.2.1. Caractérisation structurale.....	31
III.3.2.2. Caractérisation physicochimique.....	33
III.3.3. Essai d'application de biosurfactant	35
III.3.3.1. Pouvoir émulsifiant.....	35
III.3.3.2. Application pour la préparation de la mayonnaise.....	36
III.4. Identification.....	38
Conclusion générale.....	39
RECOMMANDATIONS.....	39
REFERENCES	42
Les annexes	

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Structure simplifiée d'un tensioactif.....	10
Figure 2 : Formation d'une micelle dans la solution de surfactant	11
Figure 3 : Sols contaminés par le pétrole brut.....	20
Figure 4 : Schéma récapitulatif du test d'émulsion (E-24).....	22
Figure 5: Effet du milieu de culture et la source de carbone sur la production du biosurfactant par les trois souches (T = 45°C, Temps d'incubation = 48h, 150 tr/min). a- pétrole brut, b- huile d'olive	27
Figure 6 : Effet de la source du carbone sur la production du biosurfactant (T= 45°C, Temps d'incubation = 48j, 150 tr/min). a- souche K7D (huile d'olive, 1% v/v), b- souche K7G (pétrole brut, 1% v/v), c- souche K1C (pétrole brut, 1% v/v).....	28
Figure 7 : Effet de la concentration de l'huile d'olive sur la production de biosurfactant de la souche K7D	30
Figure 8 : Effet de la concentration du pétrole sur la production de biosurfactant par la souche K7G	30
Figure 9 : Biosurfactant récupéré après extraction	31
Figure 10 : Spectre de FTIR du biosurfactant issu d'une souche K7G	32
Figure 11 : Effet de la variation de pH sur la stabilité de biosurfactant produit par la souche K7G.....	34
Figure 12 : Effet de variation de la température sur la stabilité biosurfactant issu de la souche K7G.....	35
Figure 13 : Pouvoir émulsifiant de biosurfactant sur l'huile d'olive et l'huile végétale.....	36
Figure 14 : Activité émulsifiante pour la souche K7G (photos).....	36
Figure 15: Photo d'une mayonnaise au blanc d'œuf préparée au laboratoire a- en présence de biosurfactant produits par la souche K7G, b- sans biosurfactant.....	37
Tableau 1: Principaux types de surfactants biologiques	14
Tableau 2 :Différents domaines d'applications de biosurfactants.....	15
Tableau 3 : Toxicité de biotensioactif comparés à celle de surfactant chimique.....	17

LISTE DES ABREVIATIONS

CMC : Concentration Micellaire Critique

E24 : Activité Émulsifiante

LB : LuriaBertani

MM : Milieu Minimum

TS : Tension de Surface

INTRODUCTION

Les tensioactifs sont généralement des composés organiques utilisés dans de nombreuses industries (textiles, 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 agroalimentaires, 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) (Eddouaouda *et al.*, 2012).

En raison de leur toxicité, les tensioactifs chimiques sont de plus en plus remplacés par des molécules issues des organismes vivants, spécialement les microorganismes, appelées biosurfactants. Ces derniers possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ils ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et efficaces (West et Harwell, 1992 ; Sullivan, 1998).

Les sites contaminés par les hydrocarbures sont des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes, notamment les bactéries, ayant une capacité productrice élevée de biosurfactants. A cet effet une collection des souches bactériennes, isolées à partir d'un sol algérien contaminé par le pétrole brut et qui ont déjà 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 ayant un potentiel important à produire des biosurfactants ont été isolées dans le cadre des travaux de recherche de l'équipe de biomolécules dirigée par Pr.Badis au sein du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (LCSNBioMol) de l'université SaàdDahlab de Blida.

L'objectif de ce présent travail est d'étudier la production et la caractérisation d'un biosurfactant, issu d'une souche thermophile isolée localement, en vue d'une application en agroalimentaire. Des principaux facteurs affectant la production et la caractérisation de biosurfactant ont été étudiés à savoir : la nature de la souche, la nature et la concentration de la source du carbone et, la stabilité physicochimique de biosurfactant vis-à-vis la température et le pH. Ainsi qu'un essai d'application de biosurfactant en agroalimentaire comme agent émulsifiant dans la préparation de la mayonnaise a été envisagé.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Tensioactifs

Les tensioactifs ou surfactants (chimique ou biologique) sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire composées de deux parties: L'une hydrophobe (ou lipophile), la queue, et l'autre hydrophile, la tête, comme le montre la figure 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 (Fiechter, 1992 ; West et Harwell, 1992; Banat *et al.*, 2000).

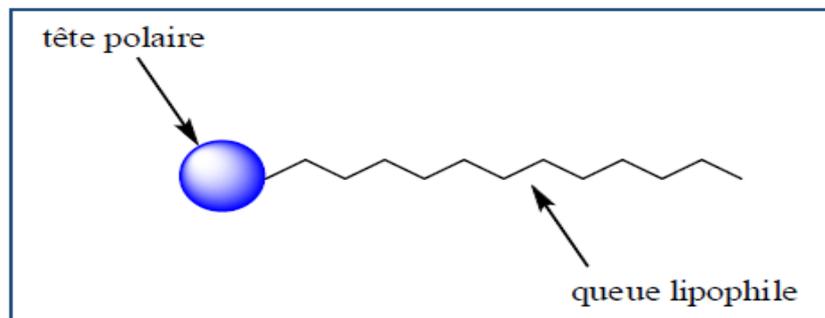


Figure 1: Structure simplifiée d'un tensioactif(Desai et Banat, 1997)

I.2. Mode d'action des tensioactifs

Aux interfaces eau-matière grasse, les tensioactifs se concentrent, leur partie lipophile s'immergeant dans le corps gras et leur partie hydrophile dans l'eau. Ces agrégats de molécules de tensioactifs ainsi formés s'appellent des micelles (Figure 2).

L'efficacité de biosurfactant dépend de sa concentration, à partir d'une concentration appelée Concentration Micellaire Critique (CMC), les monomères de biosurfactant s'associent pour former des micelles qui sont responsables de ses propriétés physiques.

La tension de surface est inversement proportionnelle à la quantité de biosurfactant, des concentrations élevées de ce dernier abaissent la tension de surface jusqu'à une valeur minimale et stable, appelée CMC. Au-delà de la CMC, les molécules de biosurfactant s'associent en solutions aqueuses pour former des micelles à l'intérieur desquelles vont pouvoir se solubiliser une grande variété de composés insolubles dans l'eau (figure 2).

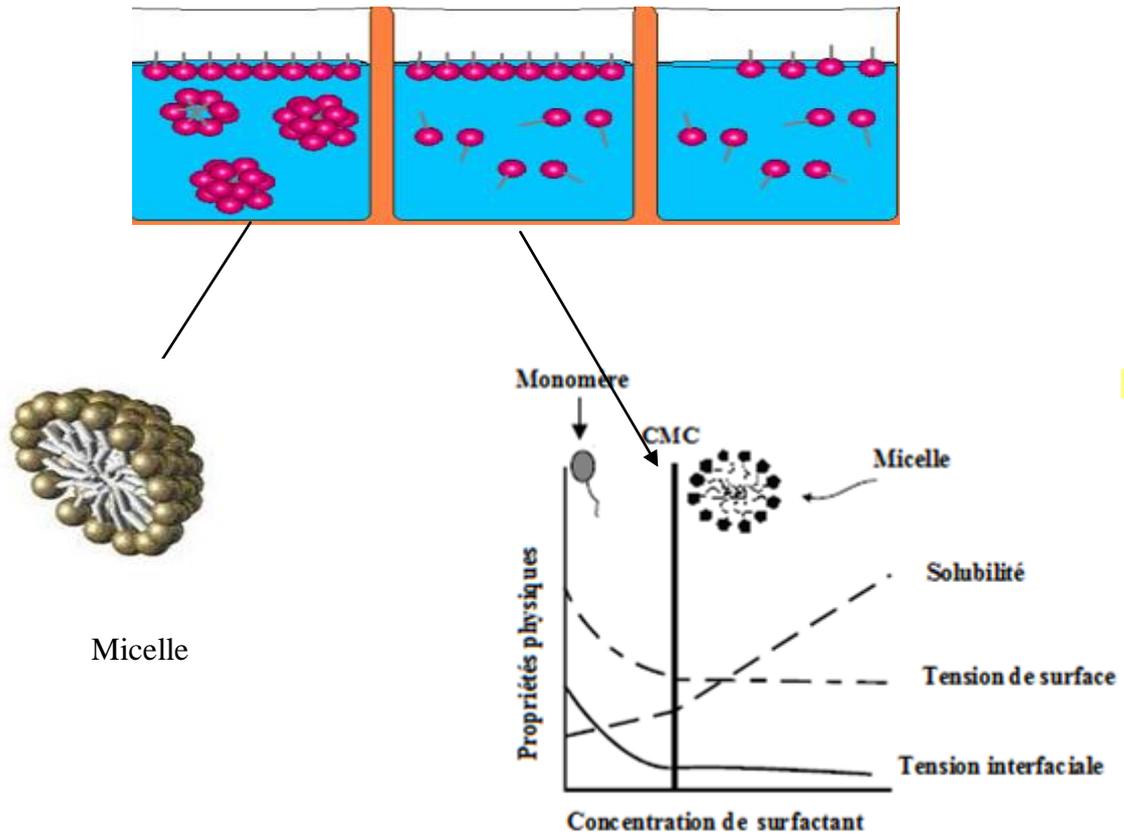


Figure 2 : Formation des micelles dans une solution de surfactant

En 2001, la production mondiale de surfactants chimique se chiffre à plus de 11 millions de tonnes par année. La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement, car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (Vipulanandan et Ren, 2000). C'est pourquoi, depuis plusieurs années et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants.

I.3. Propriétés pratiques des tensioactifs

Le mouillage : En diminuant la tension superficielle solide-liquide, les tensioactifs permettent un plus grand étalement du liquide. Ce pouvoir mouillant participe à la mise en suspension de particules solides dans un liquide dans lequel elles sont insolubles

Le moussage : La formation de mousse, dispersion d'un volume important de gaz dans un faible volume de liquide, nécessite la présence de tensioactif qui est adsorbé aux deux interfaces eau/air formant une double couche.

La dispersion : Les tensioactifs permettent de fixer les particules hydrophobes contenues dans une solution hydrophile (eau), ce qui permet de créer une dispersion, c'est-à-dire une solution aqueuse contenant des particules en suspension.

L'émulsion : Un tensioactif facilite la formation d'une émulsion entre deux liquides non miscibles (par exemple de l'eau et de l'huile).

La solubilisation : Les tensioactifs ont la propriété de dissoudre les liquides organiques insolubles (hydrocarbures) dans l'eau.

I.4. Biosurfactants

Les biosurfactants (ou surfactants biologiques) sont produits par des microorganismes très variés : Champignons, levures et en particulier des bactéries. Leur structure dépend du type de microorganisme, de la nature de substrat et des conditions de production (Parra *et al.*, 1989; Healy *et al.*, 1996 ; Desai et Banat, 1997 ; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011). 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 (C₈ à C₂₂ : linéaire ou ramifié), un acide gras à longue chaîne, hydroxy-acide gras ou α -alkyl- β -hydroxy-acide gras (Parra *et al.*, 1981; Healy *et al.*, 1996; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011).

I.5. Classification

Les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, poids moléculaire, propriétés physico-chimiques, mode d'action et l'origine microbienne.

a. Selon le poids moléculaire (Rosenberg et Ron, 1999)

- faible poids moléculaire : ils sont efficaces pour diminuer la surface et la tension interfaciale comme les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides.
- haut poids moléculaire ou polymères : connus bioémulsifiants qui sont plus efficace à stabiliser le complexe huile-eau émulsion sans réduction importante de la tension de surface. Exemple : les polysaccharides, les lipopolysaccharides ou les lipoprotéines.

b. Selon la nature biochimique

On distingue cinq grandes classes de biosurfactants : Les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les liposaccharides et les lipides neutres (Healy, 1996).

Les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acide hydroxyaliphatiques (Healy, 1996). 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, 1996). Bognolo (1999) indique 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 (Falatko et Novak, 1992 ; Desai et Banat, 1997).

I.6. Microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie. Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Les plantes, les animaux ou l'homme sont également capables d'en produire (Mulligan *et al.*, 2001;Christofi et Ivshina, 2002). Quelques biosurfactants issus de différents microorganismes sont rassemblés dans le tableau 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, on obtient un mélange de quatre rhamnolipides (Van Dyke *et al.*, 1993). Abalos *et al.* (2001) indiquent que sept homologues de rhamnolipides ont été identifiés dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* AT10.

Tableau 1 : principaux types de surfactants biologiques (Banat *et al.*, 2000 modifiée)

Microorganismes	Types de bio surfactant	Références
<i>Artrobactersp.</i> RAG-1	Hétéropolysaccharides	Rosenberg <i>et al.</i> (1979)
<i>Artrobactersp.</i> MIS38	Peptidolipides	Morikawa <i>et al.</i> (1993)
<i>Artrobactersp.</i>	Lipides de tréhalose, Lipides de saccharose	Mulligan <i>et al.</i> (2001)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Peptidolipides	Yakimov <i>et al.</i> (1995)
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactines	Amani <i>et al.</i> , (2010)
<i>Bacillus sp.</i> AB-2	Rhamnolipides	Banat, (1993)
<i>Bacillus velezensis</i>	Peptidolipides	Ruiz <i>et al.</i> (2005)
<i>Candida sphaerica</i>	Glycolipides	Sobrinho <i>et al.</i> (2008)
<i>Aspergillus ustus</i>	Glycolipoprotéine	Seghal-kiran <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida bombicola</i>	Sophorolipides	Shin <i>et al.</i> (2010)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Glycolipide	Bharali <i>et al.</i> , (2011)
<i>Ocrobactrum sp.</i> 1C	Glycolipide	Ferhat <i>et al.</i> , (2011)
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Glycopeptide	Ries <i>et Strobel</i> , (1972)
<i>Halomonas sp.</i> ANT-3b	Glycolipide	Pepiet <i>et al.</i> (2004)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CPCL	Rhamnolipide	Arutchevi <i>et Doble</i> (2010)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SH10-3B	Viscosin (Peptidolipide)	Laycock <i>et al.</i> (1991)
<i>Rhodococcus sp.</i> ST5	Glycolipide	Abu-Ruwaida <i>et al.</i> (1991)
<i>Rhodococcus sp.</i> 33	Polysaccharide	Uraiet <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhodococcus sp.</i> TA6	Lipides, Glycolipide	Shavandiet <i>et al.</i> (2011)
<i>Halomonas eurihalina</i>	Exopolysaccharides	Calvo <i>et al.</i> (2002)
<i>Staphylococcus sp.</i> 1E	Lipopeptide	Eddouaouda <i>et al.</i> (2012)
<i>Brevibacterium aureum</i>	Lipopeptide	Seghal Kiran <i>et al.</i> (2011)
<i>Brevibacterium sp.</i> 7G	Glycolipide	Ferhat <i>et al.</i> (2011)
<i>Nocaridiopsis lutensis</i>	Glycolipide	Seghal-Kiran <i>et al.</i> (2010)

I.7. Avantage des biosurfactants

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

- Bonne stabilité thermique et chimique : pH (2-10), 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 (substrateffluents des huileries, graisse animale, lactosérum, déchets riches en amidon,) en diminuant leur effet polluant et conduisant à une réduction du coût de production.

I.8. Applications de biosurfactants

Les biosurfactants sont reconnus pour être non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes (Desai et Banat, 1997 ; Banat, 2000). C'est pourquoi ils sont utilisés dans de nombreux domaines (tableau2).

Tableau 2 : Différents domaines d'applications de biosurfactants (d'après Banat, 2000)

Fonction	Champ d'application
Emulsifiant et dispersant	Cosmétiques, peintures, produit alimentaire.
Solubilisant et micro-émulsions	Pharmaceutique, articles de toilette.
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique, industrietextile, peinture.
Détergent	Nettoyantsménagers, produits de l'agriculture.
Agent moussant	Cosmétiques, articles de toilette, flottation de minerais.
Agent épaississant	Peintures.
Agent séquestrant des métaux aide à la croissance bactérienne	Minerais, traitement d'huiles usagées pour boues de STEP, fermentation.
Dé-émulsifiant	Traitement de déchets.
Agent réducteur de viscosité	Transport par pipeline
Dispersant	Séparation des mélanges goudron /pétrole ou goudron/eau.
Récupération de ressources	Récupération assistée de pétrole.

Cependant, leurs couts de production demeurent encore assez élevés et freinent leur utilisation. Les substrats de croissance pour les microorganismes producteurs de biosurfactants sont peu couteux mais le faible taux de production et les procédures de purification font que leurs couts peuvent être parfois supérieurs à ceux des tensioactifs chimiques (Van dyke *et al.*,1991 ; Fiechter, 1992).

I.9. Production des biosurfactants

Les microorganismes producteurs de biosurfactant se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures (Bognolo, 1999 ;Mulligan *et al.*,2001). La structure et les caractéristiques d'un biosurfactant dépendent des conditions de croissance, de la source de carbone utilisée et du type de microorganisme. On obtient souvent un bon rendement avec un substrat insoluble.

Le principal rôle physiologique du tensioactif est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible (Fiechtre, 1992 ; Mata-Sandoval *et al.*,2000).

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.

- **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 Avigad (1970). Elle a été déjà utilisée pour quantifier les rhamnolipides (Johnson et Boese-Marrazo, 1980)et la surfactine (Moran *et al.*, 2002). Actuellement, de nombreux chercheurs utilisent cette technique pour la sélection de nouveaux isolats producteurs de biosurfactants (Carrillo *et al.*, 1996 ; Yonebayashiet *al.*, 2000).

- **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 de surface. Car c'est la forme sphérique qui présente la surface la plus petite par rapport aux autres formes de volumes, en effet, la tension de surface est donnée par la relation $\gamma = \frac{W}{\Delta A}$; W : travail ou l'énergie qu'il faut fournir (à température et pression constantes) pour accroître la surface du liquide d'une quantité ΔA . La tension de surface s'exprime en J/m² 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.

I.10. Toxicité de biosurfactants

Bien que peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la toxicité des surfactants microbiens, ils sont généralement considérés comme des produits peu ou non-toxiques et par conséquent, ils sont appropriés pour des usages pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires et environnementaux. Le tableau 3 rassemble quelques valeurs de concentrations effectives, et montre qu'en général les biosurfactants sont moins toxiques que leurs homologues chimiques.

Tableau 3 : Toxicité de biotensioactifs comparée à celle de surfactants chimiques (Christofi et Ivshina, 2002)

Surfactant	Origine	CE50 (mg.L ⁻¹)
Rhodococcus ruber AC 235 glycolipide complexe	Biologique	650
Tréhalose dicorynomycolate de <i>R. erythropolis</i>	Biologique	49
Tréhalose tétraester de <i>R. erythropolis</i>	Biologique	286
Rhamnolipides de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Biologique	50
Stéarate de sucrose (DK 50)	Chimique	67
Finasol OSR-5	Chimique	7
Corexit 9597	Chimique	5
Inipol EAP 22	Chimique	0,004

CE50 : concentration effective à 50%, c'est-à-dire affectant 50% de la population testée

I.11. Les colloïdes alimentaires

Un colloïde est un système constitué de fines particules (1nm à 1µm) en suspension dans un milieu, formant un système à deux phases séparées qui sont respectivement à l'état gazeux, liquide ou solide. On distingue différentes catégories de colloïdes selon la nature des phases en présence (aérosol, émulsion, gel, mousse, ...). Par exemple: la mayonnaise, c'est émulsion où la phase de dispersion et la phase dispersée sont, toutes deux, liquides. Les molécules de graisse provenant du jaune d'œuf et du beurre sont en suspension dans la solution faite d'eau, de vinaigre (solution d'acide acétique) et de jus de citron.

Le système colloïde n'est pas stable thermodynamiquement. Si on mélange deux liquides miscibles comme l'eau et l'huile nous n'arriverons jamais à une émulsion quelle que soit la force avec laquelle on bat le mélange. Pour stabiliser plus longtemps une émulsion, il faut ajouter des molécules tensioactives permettant au système colloïdal de perdurer.

- **Dans le cas de la mayonnaise, le tensioactif est le jaune d'œuf**

Le type d'émulsion est eau dans l'huile (e/h), l'eau provenant de l'œuf, tandis que les protéines contenues dans le jaune d'œuf jouent le rôle de molécule tensioactif. Il existe de telles protéines dans le blanc d'œuf, mais leur teneur est très faible en comparaison avec le jaune, d'où la difficulté de monter une mayonnaise avec du blanc d'œuf.

- **Les additifs de stabilisation utilisés dans l'industrie agroalimentaire, et comme améliorants dans la boulangerie et la charcuterie (Prommachan, 2002)**

En agroalimentaire, les produits qui permettent de stabiliser les émulsions, les mousses ou les gelées portent le nom d'émulsifiants, d'épaississants et de gélifiants. Leur nomenclature est comprise entre E400 et E499 dans la codification européenne. Cependant, certains antioxydants comme les lécithines (E322) peuvent aussi être utilisées en tant qu'émulsifiants.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

II.1. Origine des souches bactériennes utilisées

La figure 3 montre le biotope utilisé pour l'isolement des souches bactériennes à fort potentiel de dégradation hydrocarbures et productrices de biosurfactants.

Ce dernier utilisé, pour isoler des souches bactériennes aérobies, est un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud, (sud d'Algérie). Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à différentes profondeurs. 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 (Eddouaouda *et al.*, 2012). Les différentes caractéristiques de ce biotope sont données en annexe I.



Figure 3:Sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud) (Eddouaouda *et al.*, 2012)

II.2.Sélection des souches productrices de biosurfactant

Trois souches bactériennes thermophiles (K1C, K7G et K7D), prises de la collection du LCSNBioMol, ont été sélectionnées pour leur performance à produire de biosurfactants. Des repiquages successifs sur milieu solide ont effectués pour la purification des souches sous forme de colonies bien isolées.

Une seule colonie a été mise dans un milieu liquide LB (10g/L de peptone, 10g/L de NaCl et 5g/L d'extrait de levure) afin de préparer les précultures de 24h à 45 °C qui seront employées pour inoculer les milieux à tester pour la production de biosurfactants.

Le milieu LB et le milieu minéral minimum (MM, voir composition en annexe II) contenant soit du pétrole brut soit l'huile d'olive à 1% (v/v) comme source de carbone ont été utilisés pour tester la production de biosurfactant. L'incubation a été assurée pendant 48h, la température est fixée à 45 °C sous une agitation de 150 tr/min.

La production du biosurfactant a été suivie par la mesure de deux grandeurs:

- **Tension superficielle**

Le milieu de production est centrifugé à 7000 tr/min pendant 15 min. Le surnageant dépourvu de biomasse est récupéré pour mesurer la tension superficielle à l'aide d'un tensiomètre de type Tensiomètre Krüss K6, GmbH. La mesure de la tension superficielle est réalisée par la méthode de l'arrachement d'anneau en platine selon Kim *et al.* (2000).

- **Indice d'émulsification (E_{24})**

L'émulsification est pratiquement estimée par l'indice d'émulsification E_{24} où on mélange des volumes égaux de surnageant (4 mL) et de solution hydrophobe (huile d'olive) dans un tube à essai, le mélange est bien agité au vortex (VTX 400) pendant 2 min jusqu'à l'obtention d'un liquide homogène, puis laisser au repos pendant 24 h avant de prendre la mesure (Abouseoudet *al.*,2008) comme le montre la figure 4.

L'indice d'émulsification est défini comme étant le rapport de la hauteur de la couche émulsionnée (H_e) sur la hauteur totale (H_t) et en multipliant par 100 (Francyetal. 1991; Bodouretal. 2004) selon la formule suivante :

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

Avec H_e : La longueur de la couche émulsionnée

H_T : La longueur totale du mélange

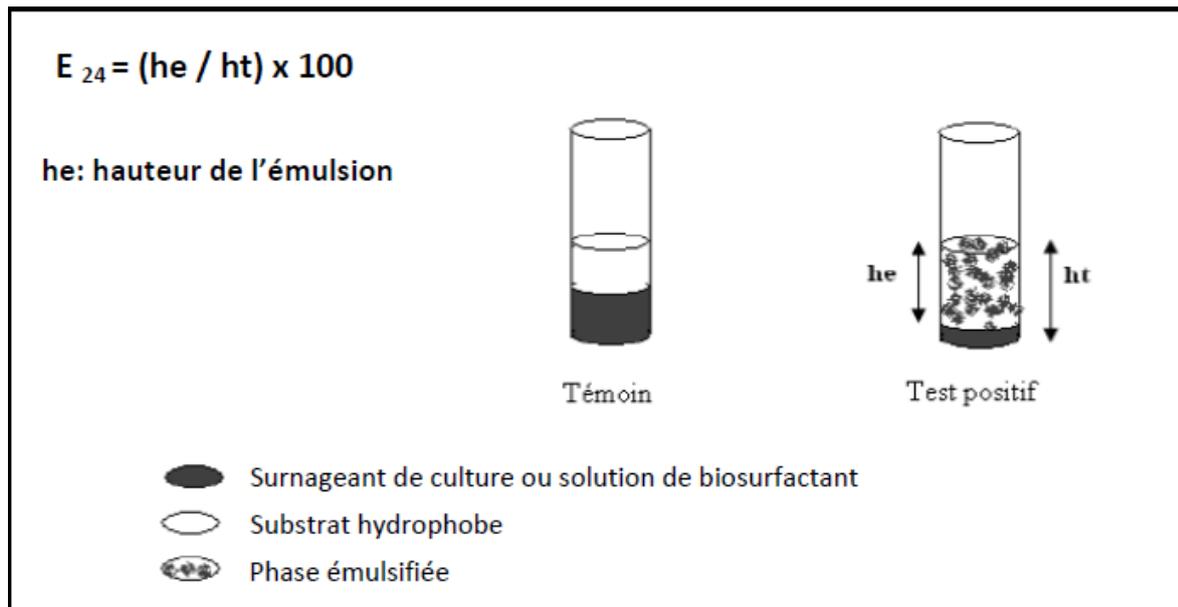


Figure 4 : Schéma récapitulatif du test d'émulsion (E_{24}).

II.3. Choix de la meilleure source de carbone

Quatre sources de carbone ont été testées à savoir : l'huile d'olive, le pétrole, l'huile de friture et l'huile de moteur à une concentration de 1% (v/v). Les milieux contenant les différents substrats ont été inoculés par les souches performantes en suivant les mêmes étapes de la section II.3. La mesure de la tension de surface et l'indice d'émulsification a été effectuée après 48h d'incubation à 45 °C sous une agitation de 150 tr/min.

II.4. Effet de la concentration de la source de carbone

La production des biosurfactants peut être affectée par la concentration de la source de carbone. A cet effet, différentes concentrations de pétrole brut et de l'huile d'olive ont été testées (0,1 ; 1 ; 2 et 3%).

II.5. Extraction de biosurfactant

La procédure de récupération est la suivante : lorsque l'activité de biosurfactant est maximale dans le surnageant (mesure de la tension de surface et la confirmation par un test rapide de déplacement de pétrole, voir détail en annexe I), le bouillon de culture est centrifugé à 7000 tr/min pendant 20 min afin d'éliminer la biomasse, le surnageant correspond au biosurfactant brut. En fait, la récupération de biosurfactant est passée par plusieurs étapes :

- Le surnageant est acidifié par HCl (2N) à pH = 2 ;
- Le liquide acidifié est conservé à 4°C pendant une nuit ;
- le précipité est récupéré par centrifugation à 7000 g pendant 20 min à 4 °C ;
- L'extraction a été effectuée deux fois (v : v) à l'aide d'acétate d'éthyle.
- Le solvant a été ensuite enlevé à l'aide d'un rotavapeur.

II.6. Caractérisation de biosurfactant

II.6.1. Caractérisation structurale

Analyse par FTIR : Le précipité du biosurfactant a été dissous dans le tétrachlorure de carbone (CCl₄). L'échantillon est préparé par micropastillage KBr de 1 ou 2 mm et à une concentration d'environ 0.004% (1 mg d'échantillon/250 mg de KBr) en masse et soumis à une pression de 20 bars/cm². La pastille ainsi formée est analysée à l'aide d'un appareil de type SHIMADZU de type FTIR 9800. Les spectres d'absorption infrarouge ont été mesurés entre 400 et 4000 cm⁻¹ et enregistrés par un logiciel Huper tous les 8 cm⁻¹ les spectres obtenus représentent $T = f(\gamma)$ avec T : transmittance, γ : nombre d'onde = $1/\lambda$ exprimé en cm⁻¹.

II.6.2. Caractérisation physicochimique

L'étude de la stabilité du biosurfactant est réalisée sur un surnageant exempt de cellules bactériennes et ceci après centrifugation à 7000 tr/min pendant 20 min. Les paramètres affectant la stabilité de biosurfactant ont été étudiés : La température et le pH. L'évaluation de la stabilité de biosurfactant a été déterminée par la mesure de la tension de surface (TS).

- Stabilité thermique

Le biosurfactant est incubé à différentes températures pendant 24 heures : 25, 70, 100 et 120 °C. Après cette durée, les mesures de TS ont été prises.

- Stabilité chimique

L'influence du pH a été également étudiée, le pH de surnageant a été modifié de 2 à 12 en utilisant des solutions de HCl et NaOH pour l'ajustement, les mesures ont été effectuées après 24 heures de repos.

II.7. Essai d'application de biosurfactant dans le domaine agroalimentaire

A du blanc d'œuf et au biosurfactant produit par la souche K7G, nous ajoutons un peu d'eau, et versons lentement de l'huile. Agitons, tout en introduisant l'huile : une petite mousse se forme d'abord puis en incorporant toujours l'huile, la mayonnaise se forme. La recette est donné en chapitre résultats et discussion.

II.8. Identification biochimique des souches sélectionnées

Une identification préliminaire a été effectuée par la galerie biochimique **API 50 CH** pour déterminer l'affiliation de trois souches isolées localement.

Les principaux tests sont : coloration de Gram, mobilité, oxydase et catalase.

Le profil fermentaire est basé sur la dégradation des carbohydrates suivants : 0- Témoin

1- GLYcérol, **2- ERY**thritol, **3- D** ARAbinose, **4-L** ARAbinose, **5-RIB**ose, **6- D** XYLose,

7- L XYLose, **8- AD**onitol, **9- B** Methyl-D-Xyloside, **10- GAL**actose, **11-GLU**ucose

12- FRUctose, **13-MAN**nosE, **14-SOR**bosE, **15-RHA**mnose, **16-DUL**citol, **17-INO**sitol

18-MANnitol, **19-SOR**bitol, **20- α** -Methyl-D-Mannoside, **21- α** -Methyl-D-Glucoside

22-N-Acetyl-Glucosamine, **23-AMY**gladine, **24-AR**Butine, **25-ESC**uline, **26-SAL**icine

27-CELlobiose, **28-MAL**tose, **29-LAC**tose, **30-MEL**ibiose, **31-SAC**chrose, **32-TRE**halose

33-INUline, **34-Me**lezitose, **35-RAFF**inose, **36-AM**Idon, **37-GLY**cogène, **38-XYL**itol

39-GENtiobiose, **40-D** TURanose, **41-D** LYXose, **42-D** TAGatose, **43-D** FUCose

44-L FUCose, **45- D** ARAbitol, **46-L** ARAbitol, **47-Gluco**NATE, **48-2-Keto-Gluconate**

49- 5-Keto-Gluconate.

Le détail de la technique de la galerie API CH 50 est donné eu annexe IV.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Production de biosurfactants par des souches bactériennes thermophiles

La production de biosurfactants par des microorganismes mésophiles a été largement étudiée. En revanche, notre travail a été réalisé à des températures supérieures à 40°C. Ceci montre l'importance des souches thermophiles utilisées dans notre cas d'étude.

III.2. Étude de la production de biosurfactants

D'après les résultats obtenus, on remarque que la faible tension de surface est enregistrée en utilisant un milieu complet (LB). Le milieu LB est un milieu riche en éléments nutritifs, ce qui justifie la croissance bactérienne rapide et le métabolisme actif en comparaison avec le milieu minimum où le pétrole et l'huile d'olive constituent la seule source de carbone et d'énergie.

Aussi, on observe que la réduction de la tension de surface est importante en présence du pétrole pour les deux souches K1C (36,6 mN/m) et K7G (34,6 mN/m). En revanche, l'utilisation de l'huile d'olive a donné une bonne réduction de la tension de surface pour la souche K7D (33,2 mN/m). Donc, le pétrole est choisi comme source de carbone pour les souches K1C et K7G, et l'huile d'olive pour la souche K7D.

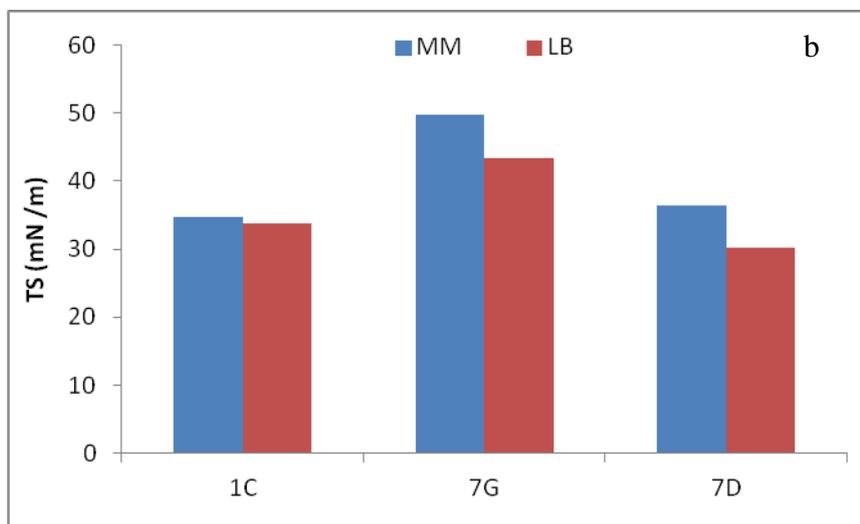
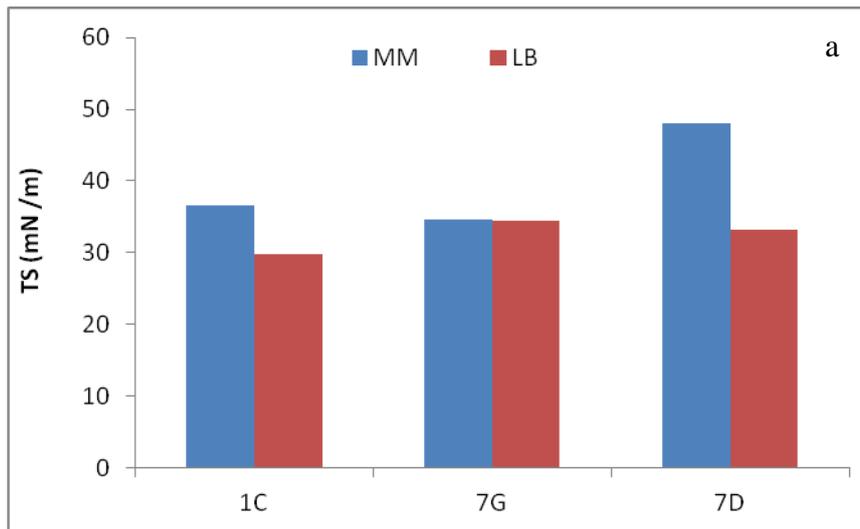


Figure 5 : Effet du milieu de culture et la source de carbone sur la production du biosurfactant par les trois souches (T = 45°C, Temps d'incubation = 48h, 150 tr/min). a- pétrole brut, b- huile d'olive

A cause aux faibles différences de la réduction de la tension de surface entre les deux milieux (LB et MM) et pour des raisons économiques, nous avons choisi le milieu minimum pour la production des biosurfactants.

III.2.1. Effet de la nature de la source de carbone

En plus de pétrole et l'huile d'olive, la capacité des trois souches (K1C, K7D et K7G) à utiliser l'huile de moteur et l'huile de friture comme sources de carbone pour la production des biosurfactants a été testée. Les figures 6a, 6b et 6c montrent l'effet de la source de carbone sur la production de biosurfactant par les trois souches thermophiles.

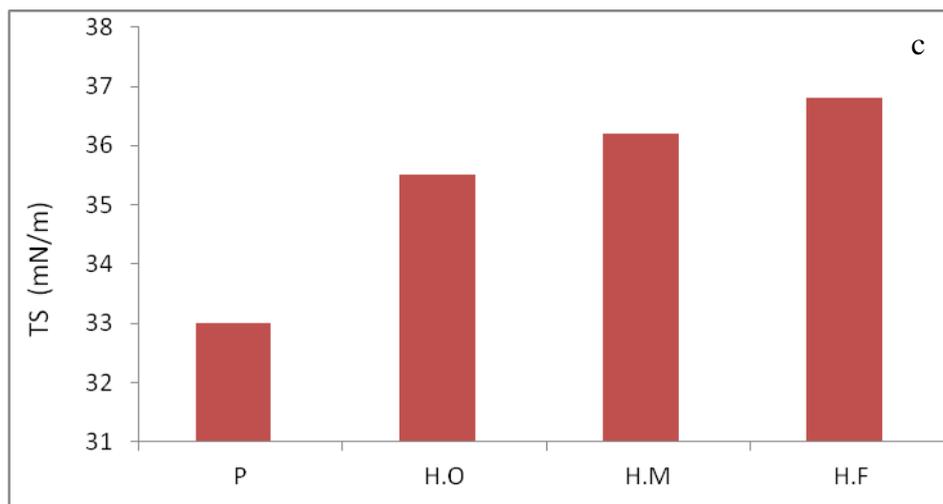
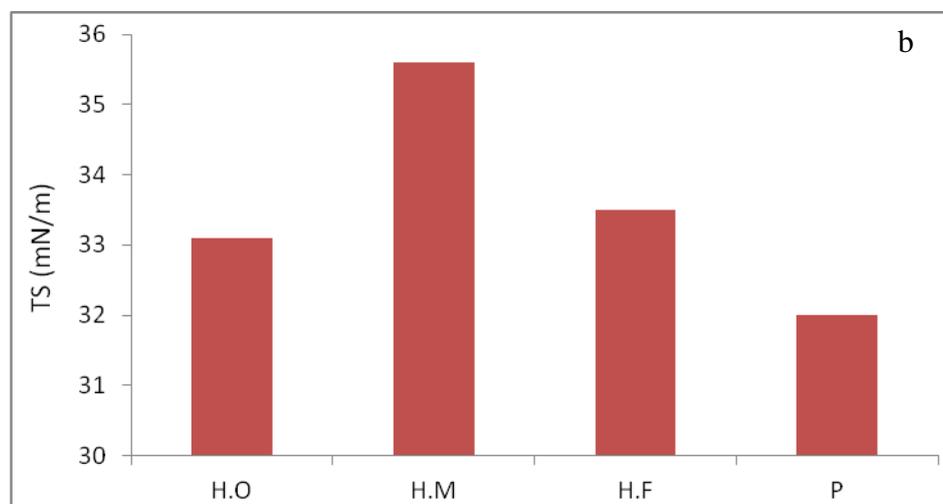
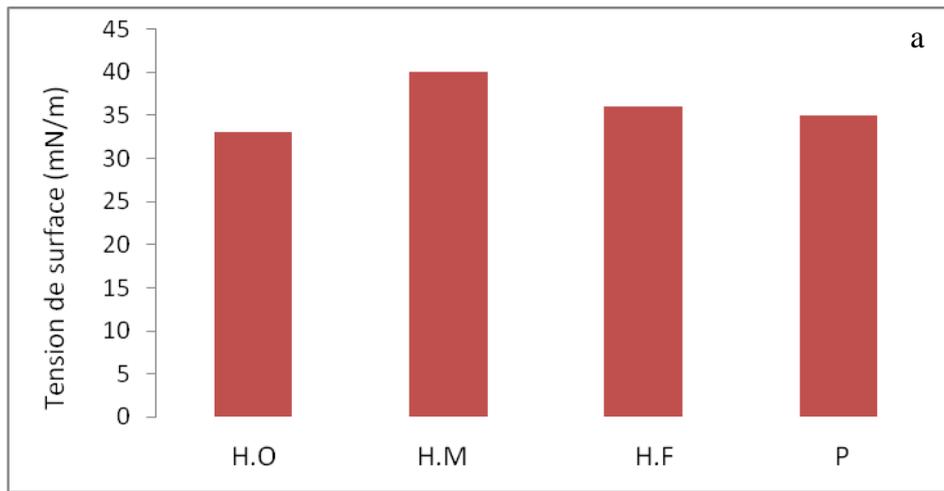


Figure 6 : Effet de la source du carbone sur la production du biosurfactant (T= 45°C, Temps d'incubation = 48j, 150 tr/min). a- souche K7D (huile d'olive, 1% v/v), b- souche K7G (pétrole brut, 1% v/v), c- souche K1C (pétrole brut, 1% v/v)

Les résultats obtenus montrent que : le pétrole et l'huile d'olive présentent des sources optimales pour la production du biosurfactant. Cela se traduit par la réduction de la tension superficielle et des valeurs d'activité émulsifiante importante.

Chez la souche K7D, l'huile d'olive était la meilleure source qui abaisse la TS à 33 mN/m avec une activité émulsifiante de 60%. Par contre, le pétrole donne de bons résultats avec la souche K7G réduisant la tension de surface jusqu'à 32 mN/m avec une activité émulsifiante égale 65% et la souche K1C diminue la tension de surface jusqu'à 33 mN/m avec une activité émulsifiante égale 60%.

Plusieurs travaux ont sélectionné une variété de sources de carbone pour une meilleure production de biosurfactant : le gasoil et le pétrole (Iloriet *al.*, 2005), l'hexadécane (Ferhat *et al.*, 2011 ; Abousaoud, 2008), l'huile d'olive (Eddouaouda *et al.*, 2012) et l'huile de tournesol résiduelle de friture (Sadouket *al.*, 2008).

III.2.2. Effet de la concentration de la source de carbone

La variation de la production des biosurfactants en fonction de la concentration de pétrole et de l'huile d'olive est illustrée dans les figures 7 et 8.

On constate que la production de biosurfactant est maximale lorsque la concentration en huile d'olive ou en pétrole est de 1%, ce qui conduit à une réduction minimale de la tension de surface. Par exemple : pour la souche K7D, TS = 32 mN/m et E24 = 60% en utilisant l'huile d'olive. Et pour la souche K7G, la TS = 33 mN/m et E24 = 65% en utilisant le pétrole brut. Également, on remarque qu'il y a une corrélation entre la tension de surface et l'activité émulsifiante: une valeur minimale de la tension de surface correspond à une activité émulsifiante maximale.

D'après les résultats obtenus, 1% (v/v) de l'huile d'olive est la concentration optimale pour la production de biosurfactant par la souche K7D (figure 7).

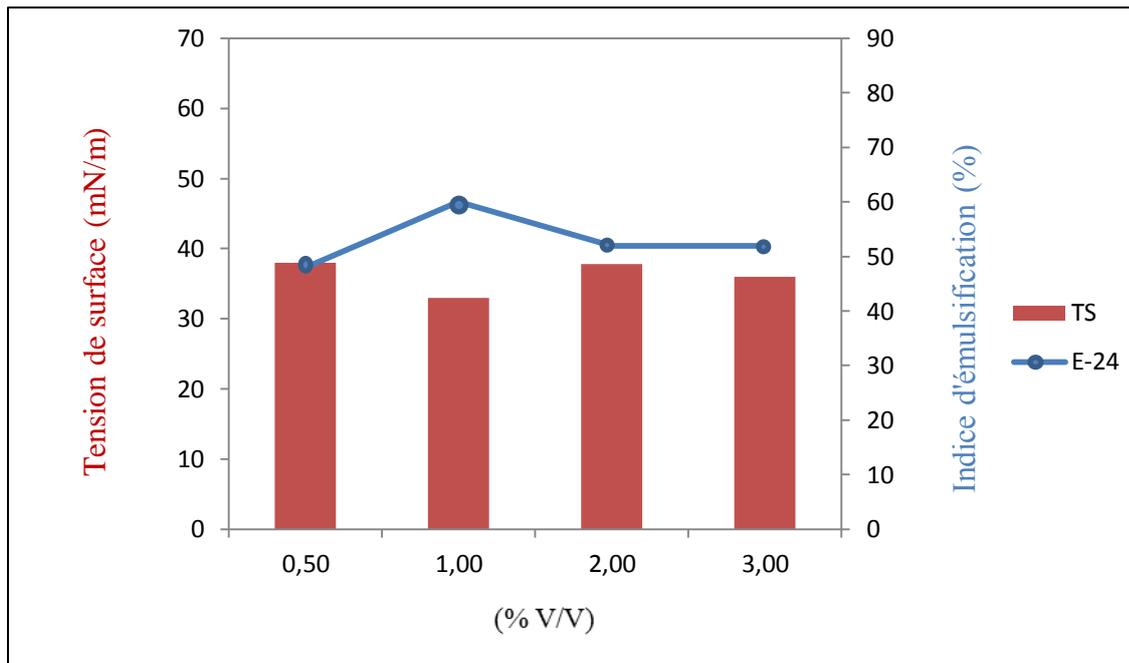


Figure 7 : Effet de la variation de la concentration de l'huile d'olive sur la production de biosurfactant par la souche K7D

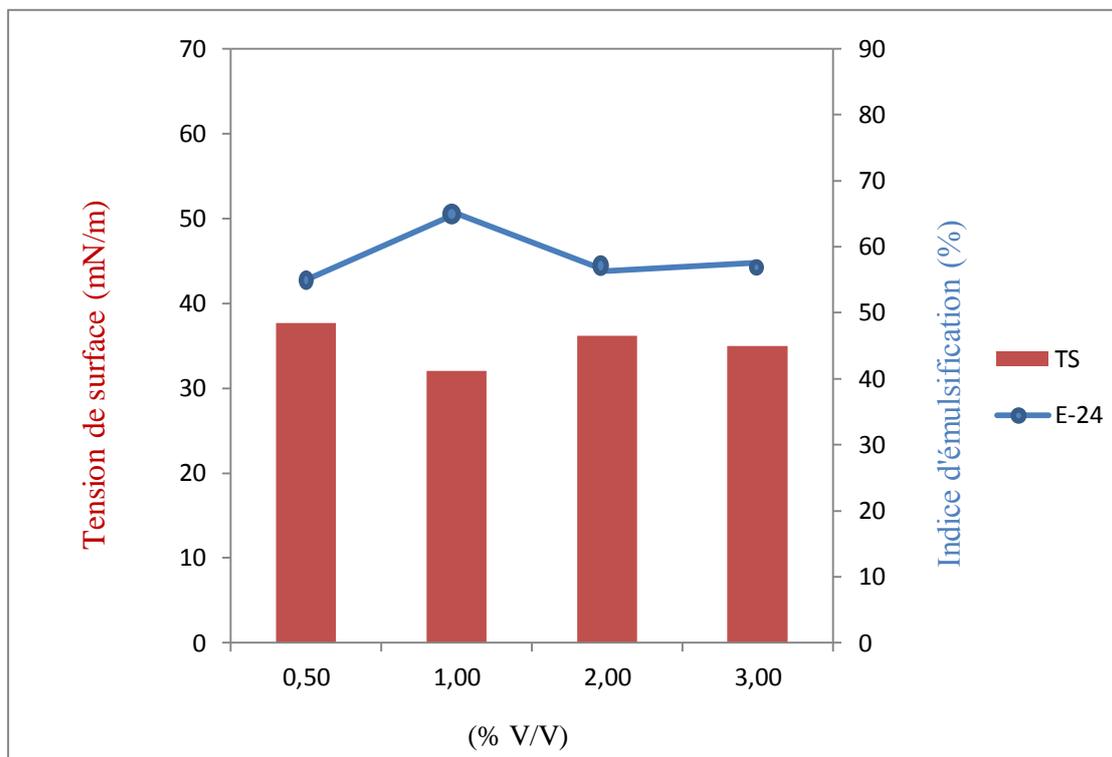


Figure 8 : Effet de la variation de la concentration du pétrole sur la production de biosurfactant par la souche K7G

III.3. Récupération, caractérisation et application en agroalimentaire de biosurfactant issu d'une souche thermophile K7G

Nous avons choisi la souche K7G pour la production de biosurfactant et également étudier ses caractérisation et application en agroalimentaire. Les conditions de production sont :

- Milieu de culture : milieu minimum (MM),
- Source de carbone : pétrole brut (1%, v/v),
- Température d'incubation est fixée à 45°C,
- Temps d'incubation est de 48h,
- pH = 7,0,
- Agitation est de 150 tr/min.

III.3.1 Extraction de biosurfactant

La récupération du biosurfactant dépend principalement de : La charge ionique, la solubilité dans l'eau ou dans les solvants organiques, et la localisation (extracellulaire, intracellulaire ou lié à la cellule). La majorité des biosurfactants sont sécrétés dans le milieu. Le précipité obtenu est une poudre cristalline soluble dans l'eau (figure 9).



Figure 9 : Biosurfactant récupéré après extraction

III.3.2. Caractérisation de biosurfactant

III.3.2.1. Caractérisation structurale

La spectroscopie d'absorption d'infrarouge permet de connaître la nature des différents groupements chimiques présents dans le biosurfactant. L'analyse de spectre d'absorption FTIR (enregistré en transmittance) a permis d'identifier la totalité des bandes d'absorption présentes dans un spectre d'infrarouge et de prédire les constituants concernés comme le montre la figure 10. Les résultats obtenus montrent que :

- Une bande large située à $3531,35 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons O-H dans l'alcool et phénol.
- Deux bandes situées à $3439,14$ et $3250,95 \text{ cm}^{-1}$ correspondent aux vibrations d'élongation des liaisons N-H dans les amines primaires et des liaisons C-H dans les alaces.
- Deux bandes de faible absorbance situées à $2885,88$ et $2834,28 \text{ cm}^{-1}$ sont dues aux vibrations d'élongation des liaisons =C-H dans les aldéhydes.
- Une bande intense située à $1629,63 \text{ cm}^{-1}$ résulte des vibrations d'élongation des liaisons C=C dans les aromatiques et des liaisons C=O dans les amides.
- Une bande significative située à $1331,91 \text{ cm}^{-1}$ est probablement due aux vibrations déformation des liaisons -CH₃ dans les alcanes ou d'élongation des liaisons C-N dans les amines
- Une bande située à $958,50 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée aux vibrations d'élongation des liaisons C-O-C.

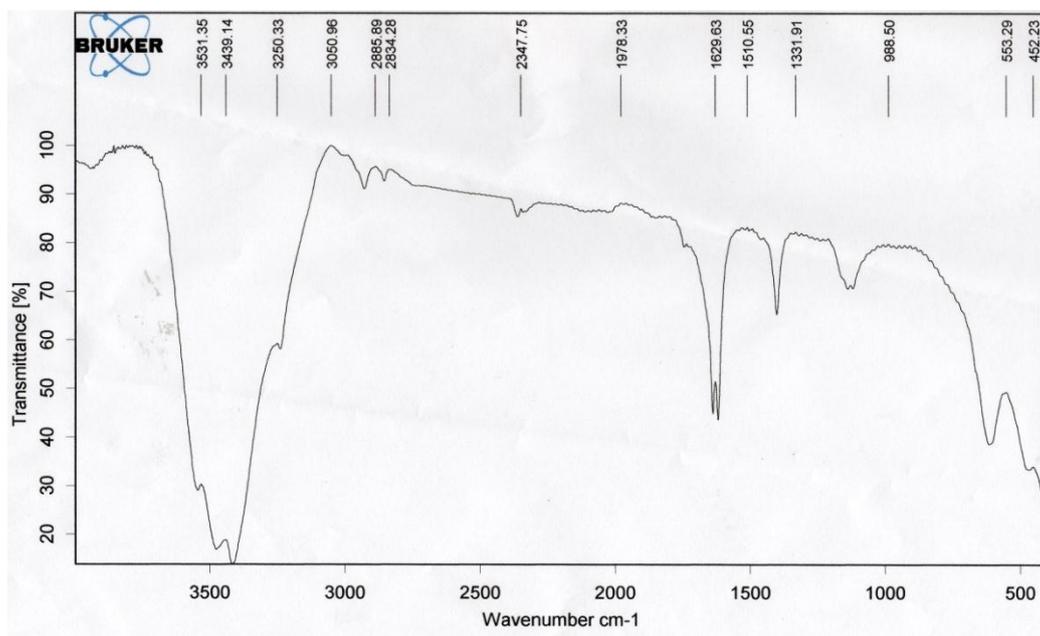


Figure 10 : Spectre de FTIR du biosurfactant issu d'une souche K7G

Il est probable que notre produit contient les glucides (liaisons O-H), les acides aminés (liaisons N-H et C-N), une chaîne aliphatique (alcane, liaisons C-H, C-H₃).

Cependant, d'autres types d'analyses sont nécessaires pour une identification plus détaillée, telles que les analyses biochimique (identification des lipides, glucides et protéines) et LC-MS (détermination de la masse moléculaire du produit et des masses des fragments (ions)).

III.3.2.2. Caractérisation physicochimique

La caractérisation (physicochimique et biologique) de biosurfactant est indispensable afin de définir ses domaines d'applications. La stabilité de biosurfactant produit par la souche 7G vis-à-vis la température et le pH a été étudié.

▪ Effet du pH

Le pH du milieu est un paramètre très important qui peut influencer la stabilité de biosurfactant. D'après les résultats obtenus (figure 11), le biosurfactant présente une très bonne stabilité dans les milieux acides et basiques, dans une gamme de pH variant de 2 à 12. Une valeur presque constante de la tension de surface dans cet intervalle, ce qui favorise son utilisation dans l'industrie.

Ces résultats sont en accord avec ceux des travaux antérieurs. En étudiant l'effet du pH sur l'activité de biosurfactant produit par la souche *Candida glabrata* UCP 1002, Luna *et al.*, (2009) ont montré que la variation du pH n'affecte pas la stabilité de biosurfactant. En revanche, en étudiant l'effet du pH sur l'activité du biosurfactant produit par *Bacillus subtilis*HOB2,

Haddad *etal.* (2009) ont trouvé qu'un pH acide (pH = 4) influe sur l'activité de biosurfactant avec une perte de l'ordre de 8 mN.m. A un pH = 3, le biosurfactant a complètement perdu son activité (TS = 39,72 mN/m) en raison de la précipitation du biosurfactant en milieu acide.

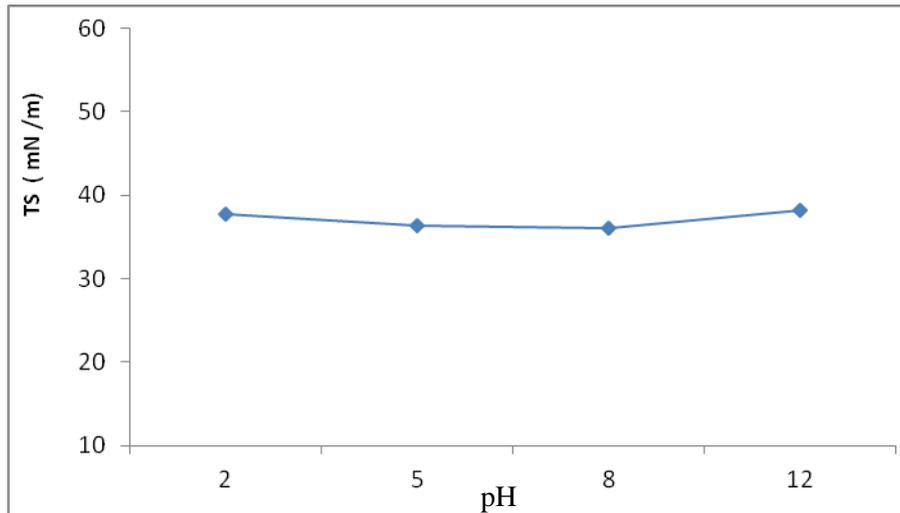


Figure 11 : Effet de la variation de pH sur la stabilité de biosurfactant produit par la souche K7G

▪ Effet de la température

La température du milieu est un paramètre très important qui peut influencer la stabilité de biosurfactant. D'après les résultats obtenus (figure 12), le biosurfactant produit par la souche K7G est considéré comme un excellent produit thermostable. Il garde ses propriétés tensioactives dans une large gamme de température (25 à 120°C). Une valeur presque constante de la tension de surface (33 à 36 mN/m) dans cet intervalle, ce qui favorise son utilisation dans l'industrie et sous différentes conditions de température. Cette forte stabilité thermique peut être expliquée par l'origine de ce biosurfactant (par une souche thermophile).

Les résultats obtenus par Brown *et al.* (1991) indiquent que l'exposition de biosurfactant produit par une souche bactérienne (désignée par isolat 1165), à des températures extrêmes [0, 4, 100 et 120 °C] n'affecte pas la stabilité thermique de biosurfactant. D'autre part, Makkar et Cameotra (2002) ont observé que la tension de surface conserve sa stabilité après l'exposition de biosurfactant produit par la souche *Bacillus subtilis* à une température de 100 °C.

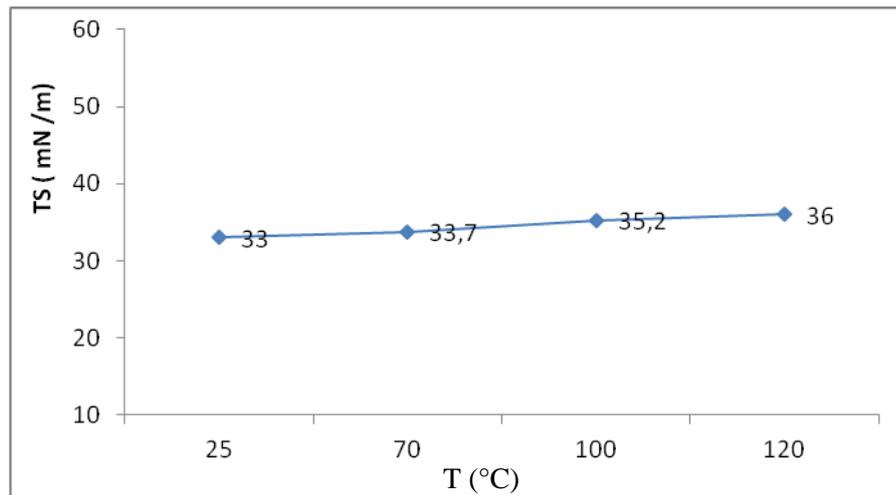


Figure 12 : Effet de la variation de température sur la stabilité biosurfactant produit par la souche 7 G

III.3.3. Essai d'application de biosurfactant

III.3.3.1. Pouvoir émulsifiant

Une émulsion est un système comprenant au moins deux liquides non miscibles, dont l'un est dispersé dans l'autre, sous une forme plus ou moins stable. Elle est souvent décrite comme une dispersion de gouttelettes de l'une des phases dans l'autre. On distingue donc une phase dispersée et une phase continue, souvent aqueuse (ex. eau) et huileuse (ex. huile). Pour assurer la stabilité de l'émulsion, il est nécessaire d'utiliser un agent émulsifiant. Il existe plusieurs types d'émulsions, les émulsions simples appelées eau-dans-huile (E/H) quand des gouttelettes d'eau sont dispersées dans la phase huileuse, et huile-dans-eau (H/E) pour l'inverse (Eddouaouda, 2012).

L'activité émulsifiante de biosurfactant produits par la souche K7G est testée contre deux natures d'huile (végétale et d'olive). La figure 13 montre les résultats obtenus.

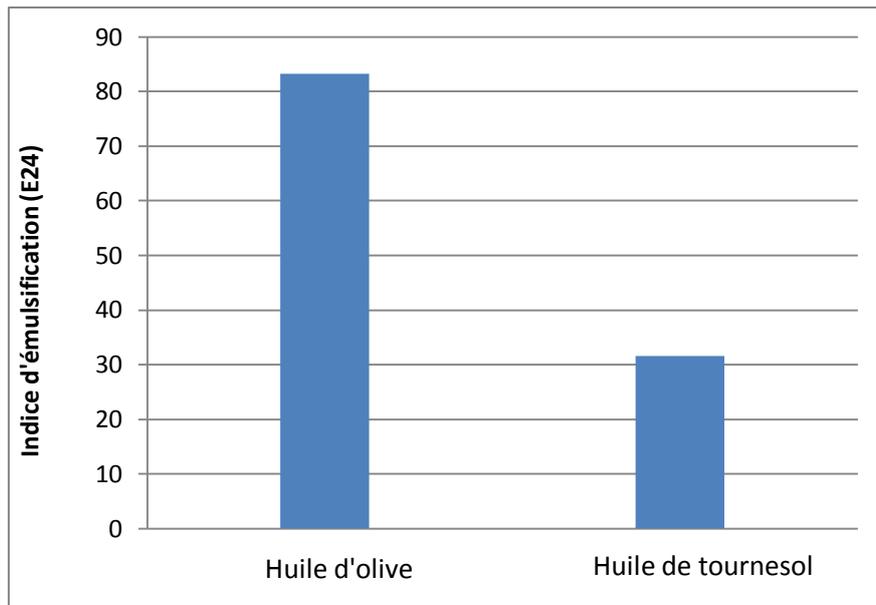


Figure 13 : Pouvoir émulsifiant de biosurfactant

Les valeurs de l'activité émulsifiante, traduit par l'indice E_{24} , de biosurfactant montre qu'un maximum d'émulsification est obtenu avec l'huile d'olive ($E_{24}=80\%$) comme le montre la figure 14.



Figure 14 : Activité émulsifiante pour la souche K7G

III.3.3.2. Application pour la préparation de la mayonnaise

- **Ingrédients :**

- 1 blanc d'œuf.
- 1 cuillère à café de moutarde.

- L'huile d'olive.
- Biosurfactant produits par la souche K7G.

Pour mélanger l'huile et l'eau de façon stable, il faut la présence de molécules ayant une affinité à la fois l'huile et pour l'eau : ces molécules sont dites tensioactives. La figure 15 montre une mayonnaise au blanc d'œuf+ Biosurfactant produis par la souche K7G



a



b

**Figure 15 : photo d'une mayonnaise au blanc d'œuf préparée au laboratoire
a- en présence de biosurfactant produit par la souche K7G, b- sans biosurfactant**

Les biosurfactants sont utilisés dans le domaine alimentaire, ils jouent habituellement un rôle anti-adhésif et comme des agents de formulation de produits alimentaires, comme ingrédient qui favorise la formation et la stabilisation de l'émulsion en raison de leur capacité à diminuer la tension superficielle et interfaciale. Ils sont également utilisés pour contrôler l'agglomération des globules de matière grasse, de stabiliser les systèmes aérés, d'améliorer la texture et la durée de vie des produits contenant l'amidon, modifier les propriétés rhéologiques des pâtes au blé et améliorer la cohérence et la texture des produits à base de matière grasse (Ramkrishna Sen, 2010).

Les biosurfactants sont souvent utilisés en agroalimentaire pour solubiliser deux phases non miscibles comme dans le cas de margarine, chocolat, mayonnaise. On sait aujourd'hui que ce sont les protéines de jaune d'œuf plus que les lécithines qui sont responsables des mayonnaises (de l'émulsion stable) (Muthusamy *et al.*, 2008). C'est pour cette raison que l'on peut aussi faire une mayonnaise au blanc d'œuf étant donné qu'il y a environ 12.5 % de protéines de blanc d'œuf (albumine), on peut donc faire une mayonnaise sans jaune d'œuf si des tensioactifs sont présentés dans le mélange (tel que le biosurfactant produit par la souche 7G).

CONCLUSION GENERALE

Dans le cadre de ce présent travail, nous avons essayé d'apporter notre contribution à l'étude de la production, la caractérisation et l'application en agroalimentaire de biosurfactant issu 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 sélection des souches productrices de biosurfactant et de la source de carbone. Trois souches bactériennes thermophiles (isolées à 45°C) ont été utilisées pour la sélection de la meilleure souche productrice de biosurfactants.

Les résultats obtenus ont révélé que les trois souches utilisées sont productrices de biosurfactant : Les valeurs de la réduction de la tension de surface étaient 32, 33 et 33,1 mN/m pour les souches K7G, K1C et K7D, respectivement. Ainsi, deux sources de carbone ont été sélectionnées à savoir le pétrole brut (1%, v/v) pour les souches K7G et K1C et l'huile d'olive (1%, v/v) pour la souche K7D. Egalement, vu la faible différence de la réduction de la tension de surface entre les milieux de culture (minimum et LB), le milieu minimum peut être utilisé, afin de minimiser le coût de la production de biosurfactant.

La seconde partie de l'étude nous a permis d'évaluer l'efficacité du biosurfactant, issu de la souche K7G, en étudiant ses caractéristiques physicochimiques et structurales, ainsi son application en agroalimentaire. Les résultats obtenus ont montré que : le biosurfactant produit par K7G est très stable thermiquement dans une gamme de température très large (25 à 120°C). Ainsi, il présente une très bonne stabilité dans les milieux acide et base, dans un intervalle de pH variant de 2 à 12. Egalement, une bonne émulsion est obtenue avec l'huile d'olive (E24 = 83,3 %) et le pétrole brut (E24 = 65 %). Finalement, une application de ce biosurfactant en agroalimentaire a été réalisée par la préparation d'une mayonnaise.

Recommandations

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

- Etude d'autres caractéristiques de biosurfactant issu de la souche thermophile K7G comme l'effet de la salinité, l'activité antimicrobienne et la détermination de la concentration micellaire critique (CMC),
- Utilisation d'autres analyses et techniques (analyse biochimique et LC-MS) pour caractériser structurellement le biosurfactant,
- L'utilisation d'autre technique d'analyse pour confirmer la structure de biosurfactant produit par la souche K7G,
- Identification de la souche K7G par les outils de la biologie moléculaire,
- Poursuivre l'application pour la préparation de la mayonnaise par une caractérisation rhéologique et sensorielle.

Référence

A

- Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, Garcia F & Manresa A (2001) Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17: 1367–1371
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. et Nabi, I. 2008. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination* 223, 143-151
- Amani H, Mehrnia MR, Sarrafzadeh MH, Haghighi M, Soudi MR. Scale up and application of biosurfactant from *Bacillus subtilis* in enhanced oil recovery. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;162:510–523.
- Arutchelvi, J. & Doble, M. (2010). Characterization of glycolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* CPCL isolated from petroleum-contaminated soil. *Lett Appl Microbiol.* 51: 75-82.

B

- Banat, I. (1993) The isolation of a thermophilic biosurfactant-producing *Bacillus* species, *Biotechnology Letters* 15:591-594.
- Banat I. M., Makkar R.S. and Cameotra S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 495-508.
- Bernheimer A. W. and Avigad L. S. (1970). Nature and properties of a cytological agent produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology.* 61: 361 - 369.
- Bharali , S., Das , B.K., Konwar , A.J., (2011). Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation *International Biodeterioration & Biodegradation*10, - 01:19
- Bodour, A.A., Gerrero-Barajas, C. et Maier, M. 2004. Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by Flavolipid sp. Strain MTN11. *App and Env Microbiol*, 10(6): 1114-20.
- BOGNOLO G. (1999). Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons *Colloids and Surfaces* 152:41-52
- Brown M.J. (1991). Biosurfactants for cosmetic applications. *International Journal of Cosmetic Science.* 13, 61-64.

C

- Calvo, C., Martínez-Checa, F., Toledo, F.L., Porcel, J. & Quesada, E. (2002). 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: 347-351.
- Christofi, N. and I.B. Ivshina, 2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *J. Applied Microbiol.*, 93: 915-929.
- Carrillo P. G., Mardaraz C., Pitta-Alvarez S. J. and Giulietti A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *J. World Microbiol. Biotechnol.* 12: 82– 84.

D

- Desai JD, Banat IM. Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol R* 1997;61(1):47-64

E

- Eddouaouda kamal (2012). Etude du potentiel biodégradatif de souches isolées du sol de Hassi-Messaoud contaminé par du pétrole : Criblage, biodégradation de HAp et production de biosurfactant. Thèse de Doctorat, Université Saad Dahlab-Blida. 210p
- Eddouaouda kamal, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Sonia Ben Younes, Slim Cherif, Samira Ferhat, Najla Mhiri, Mohamed Chamkha1 and Sami Sayadi. (2012). 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. 1 – 11.

F

- Falatko D.F. and J.T. Novak. 1992. Effects of biologically produced surfactants on the mobility and biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Water Environ. Res.* 64 : 163–169.
- Ferhat samira, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Kamel Eddouaouda, Redha Alouaoui, Ahmed Boucherit, Najla Mhirib, Nadji Moulai-Mostefa, Sami Sayadi (2011). Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by *Ochrobactrum* sp. 1C and *Brevibacterium* sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, pp.1182 – 88.
- Fiechter A., "Biosurfactants: moving towards industrial application", *Tibtech*, 10, (1992), 3 - 12.
- Franczy, D.S., Thomas, J.M., Raymond, R.L. et Ward, C.H. 1991. Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria. *J Industrial Microbiol*,8: 237-46.

H

- Haddad N. I. A., Ji Wang and Bozhong Mu (2009). Identification of a Biosurfactant Producing Strain: *Bacillus subtilis* HOB2. *Protein & Peptide Letters*, 16, 7-13.
- Healy, M.G., Devine, C.M. et Murphy R. 1996. Microbial production of biosurfactants. *Resources, Conservation and Recycling*, 18, 41-57.

I

- Ilori O. M., Amobi C. J. and Odocha A. C. (2005). Factors affecting the production of oil degrading *Aeromonas sp.* Isolated from a typical environment. *Chemosphere*, 61(7) : 985 - 992.

J

- Johnson M. K. and Boese-Marrazzo D. (1980). Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 29 (3), 1028 - 1033.

K

- Kim, S.H., Lim, E.J., Lee, S.O., Lee, J.D., Lee, T.H. 2000. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia sp.* L417. *Biotechnology Applied of Biochemistry* 31, 249-253.

L

- Laycock, M.V., Hildebrand, P.D., Thibault, P., Walter, J.A. Wright, J.L.C. (1991). Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Agric. Food Chem.* 39: 483-489.
- Luna J. M., Sarubbo L. and Campos-Takaki G. M. (2009). A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*. Vol.52, n. 4: pp.785-793,

M

- Makkar, R. S. and Cameotra, S. S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied and Microbiological Biotechnology* 58, 428-434.
- 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.

- Morikawa, M., H. Daido, T. Takao, S. Murata, Y. Shimonishi and T. Imanaka, 1993. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. strain MIS38. *J. Bacteriol.*, 175: 6459-6466.
- Moran A. C., Martinez M. A. and Sineriz F. (2002). Quantification of Surfactin in Culture Supernatant by Hemolytic Activity. *Biotechnol Lett.* 2002; 24: 177-80.
- Mulligan C N, Yong R N, Gibbs B F, 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: A review. *Engineering Geology*, 60(1-4): 371–380.
- Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Ravi T.k., Sivachidambaram P., 2008, Biosurfactants: properties, commercial production and application, *Curren Science.* 94, 736-746.

P

- Pacwa Plociniczak M., Plazo G.A., Piotrowska Z. and Cameotra S.S., "Environmental applications of biosurfactants: Recent Advances". *Int. J. Mol. Sci.* 12, (2011), 633 - 654.
- Parra, J.L., Guinea, J., Manresa, M.A., Robert, M., Mercadé, M.E., Comelles, F. et Bosch, M.P. 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants, *J.A.O.C.S.*, 66, 141-145.
- Pepi, M., Cesaro, A., Liut, G. & Baldi, F. (2004). An antarctic psychrotrophic bacterium *Halomonas* sp. Ant-3b, growing on n-hexadecane, produces a new emulsifying glycolipid. *FEMS Microbiology Ecology.* 53: 157-166.
- Prommachan, O. 2002. Production and application of bio- surfactant from *Bacillus* MUV4. Master of Science Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University, Songkhla, Thailand. 107p

R

- Ramkrishna Sen. Biosurfactant, Landes Bioscience and Springer Science +Business Media, LLC, 2010.
- Ries, S.M. Strobel, G.A. (1972). *Biological proprieties and pathological role of a phytotoxic glycolipeptide from culture of Corynebacterium insidiosum.* *Plant Pathol* 2: 133-142
- Rosenberg E. and Ron E.Z., "High- and low-molecular-mass microbial surfactants", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, (1999), 2154 - 162
- Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, Gutnick DL. Emulsifier *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol* 1979;37:402–408.

- Ruiz-Garcia, C., Bejar, V., Martinez-Checa, F., Llamas, I. & Quesada, E. (2005). *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Ve´lez in Ma´laga, southern Spain. *Int J Syst EvolMicrobiol* 55: 191-195.

S

- Sadouk, Z., Hacene, H. & Tazerouti, A. (2008). Biosurfactants Production from Low Cost Substrate and Degradation of Diesel Oil by a Rhodococcus Strain. *Oil & Gas Science and Technology*. 63: 747-753.
- Seghal Kiran, G.T.A. Hema, R. Gandhimathi, J. Selvin, T. Anto Thomas, T.R. Ravji, K. Natarajaseenivasan, Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3, *Colloids Surf.*, B 73 (2009) 250 - 256
- Seghal Kiran,G. Anto Thomas, T. & Selvin, J. (2010). Production of a new glycolipid biosurfactant from marine *Nocardioopsis lucente*Snsis MSA04 in solid-state cultivation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78: 8-16.
- Seghal Kiran, G. Anto Thomas, T. Selvin, J. Sabarathnam, B. Lipton, A. P. (2011). Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture2010, VOL 101; NUMBER 7, pages 2389-2396
- Shavandi, M., Mohebali, G., Haddadi, A., Shakarami, H. & Nuhi, A. (2011). Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces* 82: 477-482.
- Shin K-H, Kim K-W, Ahn Y (2006) Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization- biodegradation process. *J Hazard Mater* 137:1831- 1837.
- Sobrinho H.B.S., Rufino R.D., Luna J.M., Salgueiro A.A., Campos-Takaki G.M., Leite L.F.C., Sarubbo, L.A., 2008, Utilization of two agroindustrial by-products for the production of a surfactant by *Candida sphaerica* UCP0995. *Process Biochemistry* 43, 912-917.
- Sullivan E. R., "Molecular genetics of biosurfactant production". *Curr. Opin Biotech.* 9, (1998), 263 - 269.

U

- Urai, M., Aizawa, T., Anzai, H., Ogihara, J., Iwabuchi, N., Neilan, B., Couperwhite, I., Nakajima, M. & Sunairi, M. (2006). Structural analysis of an extracellular polysaccharide produced by a benzenetolerant bacterium, *Rhodococcus* sp. 33. *Carbohydr Res* 341: 616-623.

V

- Van Dyke, M.I., Lee, H. and Trevors, J.T. (1991). Application of microbial surfactants. *Biotechnol. Adv.* 9: 241-252.
- Van Dyke, M.I., Couture, P., Brauer, M., Lee, H., and Trevors, J.T. 1993 Pseudomonas aeruginosa UG2 rhamnolipid biosurfactant : Structural characterization and their use in removing hydrophobic compounds from soil. *Can. J. Microbiol.* 39 : 1071 – 1078
- Vipulanandan C. and Ren X., "Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant", *Journal of Environmental Engineering*, 126, (7): (2000), 629 - 634.

W

- West C.C. and Harwell J.H., (1992). Surfactants and subsurface remediation, *Environ. Sci. Technol.*, 36, (12), 2324-2330.

Y

- Yakimov, M.M., Timmis, K.n., Wray V. and Fredrickson, H.L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1706-1713
- Yonebayashi H., Yoshida S., Ono K. and Enomoto, H. (2000). Screening of Microorganisms for Microbial Enhanced Oil Recovery Process. *Sekiyu Gakkaishi*. 43 (1). 59-69.

ANNEXE I

Caractéristiques du biotope utilisé pour l'isolement des souches productrices de

biosurfactants

Tableau 3.1 : Caractéristiques physico-chimiques du biotope

Echantillon N°	01	02	03
Paramètres	Puits OMOZ #472	Puits OMKZ #32	Puits OMKZ#502
COT (%)	2,30	7,1	3,5
N _T (‰)	0,42	1,18	0,51
COT/N _T	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 ₂ O	7,50	7,57	7,25

*COT : Carbone Organique Total ; N_T : Azote total Kjeldahl
Hydrocarbures Pétroliers Totaux*

HTP :

- 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 CE > 16

ANNEXE II

Isolement des souches bactériennes : L'isolement est basé sur la capacité des souches à croître sur le pétrole brut (mesurer la densité optique à 600 nm). En effet, les tests de biodégradation ont été réalisés dans des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture (MM), 2% (p/v) de sol contaminé par le pétrole brut et 2% (v/v) de pétrole brut comme source de carbone et d'énergie. L'incubation a été réalisée à 45°C sous une agitation de 150 tr/min (Eddouaouda, 2012).

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

- ✓ L'observation microscopique à l'aide d'un microscope optique à contraste de phase (Olympus BX50).
- ✓ La mesure de la densité optique (DO) à 600 nm a été effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre.
- ✓ Le suivi de la disparition de la couche huileuse du pétrole durant la période d'incubation qui est réalisée par l'observation visuelle permet d'évaluer la dégradation du pétrole.

Milieu de culture : Le milieu de culture liquide utilisé est à base de sels minéraux, milieu minimum (MM), sa composition (g/l) est : NH_4Cl (0,4), K_2HPO_4 (0,3), KH_2PO_4 (0,3), NaCl (10), MgCl_2 (0,33), CaCl_2 (0,05), extrait de levure (0,1) et 1 ml de solution d'oligoéléments contenant (par litre): H_3BO_4 (0,25g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,5g), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,5g), NaMoO_4 (0,06g), $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,7g). Le pH est ajusté entre 7,0 et 7,5. Ensuite, le milieu est stérilisé à 120 °C pendant 20 min.

ANNEXE III

- Les appareils utilisés:



Balance



pH-mètre



autoclave



hotte chimique



Spectrophotométrie



agitateur-incubateur



Vortex



Étuve bactériologique

ANNEXE IV

Lecture de galeries API 50CH

Deux paramètres comptent pour la lecture des réactions observées :

*l'intensité (croissance ou acidification)

*la vitesse d'apparition

La lecture des galeries doit se faire :

- à des temps d'incubation définis (3h, 6h, 24h, 48h par exemple), dépendant du microorganisme et du type de réaction étudié (fermentation ou assimilation).
- de façon semi-quantitative : on donne la note 0 aux réactions négatives et 5 aux réactions positives d'intensité maximale. Les notes 1, 2, 3 ou 4 sont données aux réactions intermédiaires (3, 4 et 5 sont considérées comme positives).
- les résultats sont notés sur les fiches de résultats comme indiqué dans l'exemple. Ils constituent le profil biochimique du microorganisme.

Parmi les galeries utilisées, on cite les API 50 CHB : pour l'identification des *Bacillus*, il est composé de Sulfate d'ammonium (2 g), extrait de levure (0.5 g), tryptone (1 g), rouge de phénol (0.18 g), base minérale (Cohen-Bazire, 10 ml), tampon phosphate (1000 ml) (Figarella et Leyral, 2006).

Tableau 4 : Composition de la galerie API 50 CH (Figarella et Leyral, 2006)

Bande 0-9	Bande 10-19	Bande 20-29	Bande 30-39	Bande 40-49
Tube/substrat	Tube/substrat	Tube/substrat	Tube/substrat	Tube/substrat
0 Témoin	10 GALactose	20 α -Methyl-D-Mannoside	30 MELibiose	40 D TURanose
1 GLYcérol	11 GLUcose	21 α -Methyl-D-Glucoside	31 SACchrose	41 D LYXose
2 ERYthritol	12 FRUctose	22 N-Acetyl-Glucosamine	32 TREhalose	42 D TAGatose
3 D ARAbinose	13 MANnosE	23 AMYgladine	33 INUline	43 D FUCose
4 L ARAbinose	14 SORbosE	24 ARButine	34 Melezitose	44 L FUCose
5 RIBose	15 RHAmnose	25 ESCuline	35 RAFFinose	45 D ARAbitol
6 D XYLose	16 DULcitol	26 SALicine	36 AMIdon	46 L ARAbitol
7 L XYLose	17 INOsitol	27 CELlobiose	37 GLYcogène	47 GlucoNATE
8 ADOnitol	18 MANnitol	28 MALtose	38 XYLitol	48 2-Keto-Gluconate
9 B Methyl-D-Xyloside	19 SORbitol	29 LACtose	39 GENTIobiose	49 5-Keto-Gluconate

Annexe V

Résultats de la lecture de l'API 50 CH pour les trois souches

CE 12138 A REF.: 7D

BIOMÉRIEUX

api® 50 CH

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49				
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

0	DAV	EFB	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXVL	ARD	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	MAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLY	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GRIT	ZNG	9AG
---	-----	-----	------	------	-----	------	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	-----	-----

Incub./Inok./Υλικό αναθραμισμού :
Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Incub./Inokub./Θερμοκρασία επώασης :

CE 12138 A REF.: 7G

BIOMÉRIEUX

api® 50 CH

Origine / Source / Herkunft /
Origen / Origen / Προέλευση /
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49				
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

0	DAV	EFB	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXVL	ARD	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	MAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU	MLZ	RAF	AMD	GLY	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GRIT	ZNG	9AG
---	-----	-----	------	------	-----	------	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	------	------	------	------	------	-----	-----

Incub./Inok./Υλικό αναθραμισμού :
Autres tests / Other tests / Andere Tests /
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Incub./Inokub./Θερμοκρασία επώασης :

