

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

UNIVESITE SAAD DAHLEB - BLIDA 1



Faculté des Sciences

Département de Chimie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : Science de la Matière

Filière : Chimie

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

**Criblage des souches productrices de biosurfactant :
Application comme agent émulsifiant en agroalimentaire**

Présenté par

KHEMISSA Hanane et HASSEIN-BEY Meriem

BADIS Abdelmalek	Professeur	Président	Université de BLIDA1
FERRADJI Fatima Zahra	MCB	Examinatrice	Université de BLIDA1
EDDOUAOUDA Kamel	MCB	Promoteur	Université de BLIDA1
HADJALA Soumia	Doctorante	Co-promotrice	Université de BLIDA1

Année Universitaire: 2021/2022

ملخص

تعتبر المواد الخافضة للتوتر السطحي بديل بيولوجي للمواد الكيميائية الخافضة للتوتر السطحي بسبب خصائصها التكنولوجية الحيوية والبيئية والصناعية. يتم الكشف عن إنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوي في وسطها من خلال عدة طرق مثل اختبار انحلال الدم وطريقة ازالة الزيت DDP واختبار كره الماء والجهد السطحي TS ومؤشر الاستحلاب E24 (%).

فحص السلالات البكتيرية المعزولة عن المواقع البحرية ؛ تم تنفيذ رواسب ملوثة بالهيدروكربونات والطحالب البحرية، تنتج مواد خافضة للتوتر البيئي/مستحلبات حيوية، في وسط تم تحسينه سابقاً على أساس الأملاح المعدنية المكونة من 1% (v/v) زيت الزيتون ، NH_4NO_3 (1 غ/ لتر) ، $PH=8$ ، الملوحة 30 غ/لتر ، تم احتضان وسط الثقافة عند 30 درجة مئوية خلال اضطراب 72 ساعة 200 طن /دقيقة . تم اختيار السلالة البكتيرية المسماة SH12 كسلالة مؤدية بسبب إمكانيات إنتاجها المثيرة للاهتمام ، بلغ التوتر السطحي ومؤشر الاستحلاب (E24) وإزاحة النفط (DDP) 31.4 مللي نيوتن /م و 45% و 7 سم على التوالي بعد 72 ساعة من الحضنة . الخافض للتوتر السطحي الحيوي هو أيضا تخليق حيوي في المرحلة الثابتة من نمو البكتيريا . إضافة عناصر لها تأثير إيجابي على نمو البكتيريا وإنتاج خافضات التوتر السطحي الحيوي ، ومع ذلك فإن الحد الأدنى من الوسط الذي يعتمد على الأملاح المكملة بأيونات الحديد يعزز إنتاج خافضات التوتر السطحي الحيوي المستحلب .تم النظر في تطبيق عامل التوتر السطحي الحيوي لدينا في قطاع الغذاء . لهذا تم إجراء تحضير المايونيز ، مكمل بخافض التوتر السطحي الحيوي. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها بناء على الاختبارات العضوية ، أنه من الممكن استخدام هذه المادة الخافضة للتوتر السطحي كإضافات في تحضير صلصة المايونيز .

الكلمات الرئيسية : خافضات التوتر السطحي الحيوية ، مستحلب حيوي ، مؤشر المستحلب E24 (%) ، التطبيق الأغذية الزراعية .

RESUME

Les biosurfactants sont considérés comme un alternatif biologique des surfactants chimiques grâce à leurs propriétés biotechnologiques, environnementales et industrielles. La détection de la production de biosurfactants dans leur milieu est effectuée par plusieurs méthodes telles que le test d'hémolyse, la méthode de déplacement d'huile DDP, le test d'hydrophobicité, la mesure de la tension de surface TS et de l'indice d'émulsification E24 (%).

Le criblage des souches bactériennes, isolées à partir de sites marins ; un sédiment contaminé par les hydrocarbures et des algues marines, productrices de Biosurfactants/bioémulsifiants, a été réalisée dans un milieu optimisé préalablement à base de sels minéraux composé de 1% (v/v) d'huile d'olive, NH_4NO_3 (1 g/L), pH 8, salinité 30 g/L. Le milieu de culture a été incubé à 30 °C pendant 72h sous agitation 200 tr/min. La souche bactérienne nommée SH12 a été sélectionnée comme souche performante à cause de ses potentialités intéressantes de production de biosurfactant. La tension de surface, l'indice d'émulsification (E24) et le déplacement de pétrole (DDP) étaient 31,4 mN/m, 45 % et 7 cm respectivement, après 72h d'incubation. Egalement, Le biosurfactant est biosynthétisé dans la phase stationnaire de croissance bactérienne. L'ajout des oligo-éléments a un effet positif sur la croissance bactérienne et la production de biosurfactant, toutefois un milieu minimum à base de sels supplémenté des ions de fer favorise la production biosurfactant à caractère émulsifiant.

L'application de nos biosurfactant dans le secteur alimentaire a été envisagée. Pour cela, une préparation de la mayonnaise, supplémentées par le biosurfactant a été réalisée. Les résultats obtenus, basés sur des tests organoleptiques, ont montré qu'il est possible d'utiliser ce biosurfactant en tant qu'additifs dans la préparation de sauce de la mayonnaise.

Mots clés : Biosurfactants, Bioémulsifiant, Indice d'émulsification E24 (%), Application agroalimentaire.

ABSTRACT

Biosurfactants are considered as a biological alternative to chemical surfactants due to their biotechnological, environmental and industrial properties. The detection of biosurfactant production in their medium is carried out by several methods such as the haemolysis test, the DDP oil displacement method, the hydrophobicity test, the measurement of the surface tension TS and the emulsification index E24 (%).

The screening of bacterial strains, isolated from marine sites; a hydrocarbon contaminated sediment and marine algae, Biosurfactant/bioemulsifier producers, was carried out in a previously optimised medium based on mineral salts consisting of 1% (v/v) olive oil, NH_4NO_3 (1 g/L), pH 8, salinity 30 g/L. The culture medium was incubated at 30°C for 72 hours with 200 rpm agitation. The bacterial strain named SH12 was selected as the performing strain because of its interesting biosurfactant production potential. The surface tension, emulsification index (E24) and oil displacement (DDP) were 31.4 mN/m, 45% and 7 cm respectively, after 72h of incubation. Also, the biosurfactant is biosynthesised in the stationary phase of bacterial growth. The addition of trace elements has a positive effect on bacterial growth and biosurfactant production, however a minimum salt-based medium supplemented with iron ions favours the production of biosurfactant with an emulsifying character.

The application of our biosurfactant in the food sector was considered. For this purpose, a preparation of mayonnaise, supplemented with the biosurfactant was carried out. The results obtained, based on organoleptic tests, showed that it is possible to use this biosurfactant as an additive in the preparation of mayonnaise sauce.

Keywords : Biosurfactants, Bioemulsifier, Emulsification index E24 (%), Application

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH le tout puissant de nous avoir aidé à réaliser ce travail.

Nous remercions sincèrement notre promoteur Mr EDDOUAOU DA KAMEL Maître de conférences B et Mme HADJALA SOUMIA Doctorante, à l'Université de BLIDA 1 qui ont accepté de superviser ce travail et surtout qui nous ont encouragé, aidé et guidé avec leur précieux conseils et leur disponibilité pour nous avoir dirigé et accomplir ce travail, et leur confiance tout au long de ce travail pour puisse avoir ce jour.

Nos remerciements s'adressent également aux membres du jury qui ont accepté de nous faire l'honneur du juger ce travail.

Nous remercions le chef de département de Chimie, tous les enseignants de notre spécialité chimie des produits naturels qui nous ont enseigné durant le cursus universitaire, et tout le personnel de la faculté des sciences de la matière de l'université de BLIDA 1 qui ont contribué à notre formation.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à ce travail.

Merci à tous



DEDICACE

Avant toute dédicace ,je tiens à remercier Dieu le tout puissant qui m'adonné le courage et la volonté pour réaliser ce modeste travail.

Je dédie le fruit de longues années d'études à tout qui me sont chers, en particulier:

*A la plus chère femme au monde, **ma mère** que Dieu la protège, elle est toujours présente avec tout son amour, sa tendresse et ses conseils.*

*A mon très **chère père** que Dieu le protège ,dont cette réussite et également grâce à sa confiance, sa patience et ses encouragements.*

*A ma **chère sœur Oum Amina**, tu es mon repère dans cette vie, sans ta présence je ne serais jamais arrivé la.*

*A mon très **chers frère** :hamza .*

*A toutes **mes amies**, Imen, Karima, Soumia, Ferial .*

*A ma **chère binôme** Meriem.*

*A toute **la promotion 2022***

A tous qui me connaissent .

HANANE



Dédicace

Je dédie ce travail

A ma mère, pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices

A mon père, pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordé

A la mémoire de ma chère tante Aicha

A mes très chers neveux Djawed, Djamel

A tous les membres de ma famille

A mon binôme Hanane

A tous mes amis

Et tous ceux qui m'aiment

M H B R S N D

MERIEM

sommaire

ملخص

Resumé

Abstract

Remerciement

Dédicace

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Introduction générale 01

Chapitre I: Synthèse bibliographique

I.1 Généralités sur les Emulsions 03

I.1.2. Définition 03

I.1.3 Caractérisation des émulsions 04

I.1.4 Les divers types d'émulsions 05

I.1.4.1 Emulsion simples 05

I.1.4.2 Emulsions multiples 06

I.1.5 Stabilité des émulsions 07

I.1.6. Formulation d'une émulsion 08

I.2 les Biosurfactants , un intérêt biotechnologique 09

I.2.1 Généralité sur les surfactants 09

I.2.1.1 Définition 09

I.2.1.2 Classification des surfactants 10

I.2.1.3 Mode d'action d'un surfactant 11

I.2.2 Biosurfactant 11

I.2.2.1 Définition 11

I.2.2.2 Classification des biosurfactant 12

I.2.2.3 Microorganismes producteurs de biosurfactants 14

I.2.2.4 Production de biosurfactants 15

I.2.2.5 Propriétés des biosurfactants 18

I.2.2.6 Applications émergentes des biosurfactants 19

I.3. Application des biosurfactants est avantageuse dans le secteur alimentaire 21

I.4. Conclusion 22

Chapitre II: Matériel et méthodes

II.1. Isolement des souches bactériennes 23

II.2 Criblage des souches productrices de biosurfactants 23

II.3 Repiquage des souches et préparation des précultures 23

II.4 Milieu de production 24

II.5 Production de biosurfactant 24

II.6 Centrifugation et filtration.....	25
II.7 Technique de détection de la production de biosurfactant.....	25
II.8 Cinétique de production du biosurfactant	27
II.9 Optimisation des facteurs de la production.....	28
II.9.1 Influence de la source de carbone.....	28
II.9.2 Influence de la source d'azote.....	28
II.9.3 Influence de la salinité.....	28
II.10. Récupération du biosurfactant.....	28
II.11. Application de biosurfactant dans le secteur alimentaire.....	29
II.11.1. Préparation des sauces émulsionnées : la mayonnaise.....	29

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants.....	31
III.2. Effet des éléments de traces métalliques sur la production de production	32
III.2.1. Milieu MM + ions de Fer.....	33
III.2.2. Milieu MM + éléments de traces métalliques (ETM).....	41
III.3. Essai d'application de biosurfactant dans le domaine alimentaire.....	42
Conclusion générale.....	44
Références bibliographique	
Annexes	

Liste des figures

Figure I.1: Les deux types d'émulsions simples.....	06
Figure I.2: Les deux types d'émulsions doubles.....	06
Figure I.3: Émulsion E/H /E observée au microscope optique à contraste de phase....	07
Figure I.4: Différentes phases d'instabilités d'une émulsion.....	07
Figure I.5: Représentation schématisé d'un surfactant, sous forme d'un monomère et micelle.....	09
Figure I.6: Représentation schématisée des émulsifiants a l'interface huile/eau et autour des gouttelettes	10
Figure II.7: Structure chimique de A) Monorhannolipide et Dirhannolipide B) Sophorolipide (lactonique), C) Surfactine, D) Emulsan.....	14
Figure II.8: Préparation de milieu Lauria Bertani.....	24
Figure II.9: Préparation de milieu minimum.....	24
Figure II.10: Appareil de centrifugation.....	25
Figure II.11: Filtration.....	25
Figure II.12: Appareille de mesure de la tension de surface.....	26
Figure III.13: Halo claire en présence de biosurfactant (souche BS2).....	34
Figure III.14: Emulsification contre huile d'olive par surnagent de différentes souche	35
Figure III.15: Evaluation de tension de surface en fonction du temps d'incubation	36
Figure III.16: Détermination du DDP après trois jours d'incubation.....	38
Figure III.17 : Déplacement de pétrole pendant 7 jours.....	38
Figure III.18 : Emulsification contre huile d'olive après deux jours d'incubation.....	39
Figure III.19: Absorbance en fonction de temps.....	41
Figure III.20: Mayonnaise préparée par le surnagent de la souche SH12.....	43
Figure III.21 : mayonnaise préparerpar biosurfactant.....	43

Liste des tableaux

Tableau I.1: Différentes fractions volumiques en fonction du type d'émulsion.....	04
Tableau I.2: Les deux types d'émulsions simples.....	05
Tableau I.3: Taille moyenne de gouttelettes.....	05
Tableau I.4: Microorganismes producteurs de biosurfactants.....	15
Tableau II.5: Quantités des ingrédients utilisés pour la sauce mayonnaise.....	30
Tableau III.6: Effet des ions de Fer sur la production de biosurfactant	34
Tableau III.7: Emulsification contre des substrats hydrophobes.....	34
Tableau III.8: Cinétique de production de biosurfactants	36
Tableau III.9: Variation de DDP (cm) en fonction du temps d'incubation.....	37
Tableau III.10: Cinétique de croissance bactérienne	40
Tableau III.11: Comparaison organoleptique de différentes bases de mayonnaise.....	42

Liste des symboles et abréviations

CMC : Concentration Micellaire Critique

DDP: Déplacement du pétrole

DO : Densité optique

E24 : Indice d'émulsification

LB : Luria Bertani

MM : Milieu Minimum

pH : Potentiel d'hydrogène

TS : Tension de Surface

°C : Degré Celsius

g: gramme.

mg : milligramme

ml : millilitre

tr/min : tours par minute

Introduction générale

Les surfactants (anglais : **Surface Active Agents**) sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Leur propriété principale est la réduction des tensions superficielle et interfaciale. Ils sont présents dans des secteurs industriels très variés. Les surfactants synthétiques sont des produits dérivés du pétrole et présentent 95% du marché international des surfactants en 2012. Le marché mondial des surfactants était estimé à 30,64 milliards USD en 2016 et devrait atteindre 39,86 milliards USD d'ici 2021[1].

Cependant, Ils présentent des risques pour l'environnement et la santé publique car ils sont généralement toxiques et non biodégradables[2]. C'est pour cette raison, et depuis plusieurs années et grâce à l'essor de la biotechnologie, que les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes, appelés biosurfactants. Ces derniers possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non ou faiblement toxiques et efficaces dans des conditions environnementales extrêmes (pH, température et salinité)[3]. La production mondiale de biosurfactants était estimée à environ 344 000 tonnes en 2013. Les ventes de biosurfactants ont dépassé 1,8 milliard de dollars en 2016. Les estimations pour 2018 étaient de 2,21 milliards de dollars avec 442 000 tonnes[4].

Les biosurfactants ont de nombreuses applications potentielles couvrant des domaines très variés tels que l'agroalimentaire, la cosmétique, la médecine, l'agriculture, les détergents, etc. grâce à leur capacité d'émulsification et de solubilisation, etc. [2]. Néanmoins, leurs coûts élevés de production soulignent la nécessité d'optimiser le processus de production pour permettre une éventuelle application à l'échelle industrielle[5].

Dans l'industrie alimentaire, les biosurfactants peuvent être utilisés pour le nettoyage et/ou le traitement des surfaces de contact, agissant comme agents antimicrobiens et anti-biofilm, et peuvent également être incorporés directement dans les formulations en tant qu'additif ou ingrédient [6]. Donc, l'utilisation de biosurfactants comme produits biologiques, dans le secteur alimentaire s'inscrit dans l'intérêt croissant des consommateurs pour les aliments naturels, biologiques et végétaliens, nécessitant le développement de biomolécules aux propriétés technologiques capables de réduire voire de supprimer l'utilisation de tensioactifs synthétiques[7, 8, 9]. A l'avenir, les produits à base de biosurfactants fourniront un produit

biologique meilleur, sûr et peu toxique par rapport aux produits chimiques dangereux pour la santé et induisant une écotoxicité.

Le critère utilisé pour sélectionner les microorganismes producteurs de biosurfactants est la capacité de réduire la tension superficielle (TS) au-dessous de 40 mN.m^{-1} , le diamètre de déplacement de pétrole (DDP) supérieur à 3 cm et la capacité de stabilisation de l'émulsion évaluée par l'indice d'émulsification (E_{24}) de la maintenir au moins 50 %. Selon leurs poids moléculaires, les biosurfactants sont classés en deux classes : les faibles poids moléculaires appelés biosurfactants et les hauts poids moléculaires appelés bioémulsifiants. Ces derniers jouent un rôle primordial dans la formulation et la stabilisation des émulsions qui sont plus utilisées dans les secteurs alimentaires, cosmétique et pharmaceutique. Pour formuler une émulsion il faut une phase hydrophile et une phase lipophile. Ces deux phases étant naturellement non miscibles, on utilise un bioémulsifiant à fin d'homogénéiser ces deux phases. Le biosurfactant/bioémulsifiant est le constituant clé, sans lui, il est impossible de former une émulsion.

L'objectif principal de ce travail de mémoire est la sélection de la souche performante productrice bioémulsifiant, la production et la caractérisation physico-chimique, et l'application de ce bioémulsifiant dans le domaine alimentaire pour la préparation de la mayonnaise.

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. À cet effet, nous apporterons différentes informations concernant les émulsions (propriétés, stabilité, formulation, ...) et les biosurfactants (production, application, ...).
- 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 proposerons une synthèse des résultats obtenus, et dégagerons les perspectives de la poursuite de ce travail de recherche.



Chapitre I
Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur les émulsions

Les émulsions sont omniprésentes dans les domaines de l'industrie alimentaire, cosmétique et chimique, ou encore dans le domaine paramédical. Elles permettent d'obtenir des textures et des propriétés particulières dans un produit. Les gouttelettes présentes dans une émulsion peuvent interagir avec d'autres composés afin de créer de nouvelles structures, assurer la diffusion de principes actifs ou encore favoriser le transport de molécules hydrophobes.

L'étude des émulsions est ainsi complexe mais primordiale dans le domaine industriel pour assurer des produits stables posés dans les propriétés attendues par le consommateur. Dans le contexte actuel, le désir des consommateurs est d'acheter des produits de plus en plus naturels. Par conséquent, il est nécessaire de rechercher et de formuler des émulsions sans ingrédients d'origine chimique.

Les émulsions font partie de la famille des colloïdes, que l'on peut définir comme un système composé de deux phases distinctes en suspension et dont la dimension caractéristique (diamètre des gouttelettes ou longueur des discontinuités) se situe entre le micromètre et le nanomètre. Il existe une grande variété de classes de colloïdes en fonction de la nature des deux phases[10].

I.1.2. Définition

Une émulsion se définit comme la dispersion de deux phases liquides non miscibles. C'est un mélange de solutions lipophile et hydrophile se caractérisant par la présence de deux phases distinctes dont l'une est dispersée dans l'autre. On appelle phase dispersée ou phase discontinue, le liquide formant des gouttelettes, alors que l'on désigne le second fluide comme étant la phase dispersante ou la phase continue. Une émulsion peut être fluide, crémeuse ou même gélifiée, donnant toute une gamme de textures qui expliquent l'intérêt que portent à ces systèmes des domaines industriels tels que la cosmétique, la pharmacologie et l'agroalimentaire.

Une émulsion possède un aspect macroscopique homogène alors que sa structure microscopique est hétérogène. Cette répartition des deux liquides s'explique par la présence d'une énergie de surface au niveau de l'interface appelée tension interfaciale. Lorsque cette force est faible, on a besoin d'apporter moins d'énergie pour augmenter la surface des gouttelettes. L'émulsion est alors plus stable car on favorise la séparation des phases [11].

I.1.3. Caractérisation des émulsions

Pour caractériser une émulsion différents critères doivent être évalués grâce à différentes méthodes.

- 1- Le sens de l'émulsion (ou le type d'émulsion) se détermine à l'aide du test de la goutte (ajout d'une goutte d'émulsion dans de l'eau ou de l'huile pour observer si elle se disperse)
- 2- Le diamètre des gouttelettes dans la phase dispersée est obtenu par granulométrie. Ainsi, on peut distinguer deux types d'émulsions: les émulsions monodisperses et polydisperses.

Une émulsion monodisperse contient une seule population de gouttelettes de même taille alors qu'une émulsion polydisperse contient plusieurs populations de tailles différentes.

Remarque : La taille des gouttelettes va avoir un impact sur la turbidité d'une émulsion. En fonction de la taille des gouttelettes, la lumière est plus ou moins transmise. Plus la taille est importante, plus la diffusion de lumière l'est également. Les émulsions peuvent donc avoir des aspects variés allant du blanc laiteux à quelque chose de totalement translucide pour des gouttelettes de faibles tailles de l'ordre du nanomètre.

- 3- La fraction volumique (tableau I.1) : elle est définie comme le rapport entre le volume de la phase dispersée et le volume total.

Tableau I.1: Différentes fraction volumiques en fonction du type d'émulsion

Φ (fraction volumique)	Type d'émulsion
$< 0,02$	Émulsion diluée
$0,3 < \Phi < 0,74$	Émulsion concentrée
$> 0,74$	Émulsion très concentrée

- 4- Le rapport d'indice de réfraction entre la phase dispersée et la phase dispersante.
- 5- La distribution de la taille des gouttelettes. Celle-ci peut s'observer à l'aide d'un microscope.
- 6- La stabilité d'une émulsion peut se mesurer à l'aide du Turbiscan qui permet de suivre l'évolution des gouttelettes en suspension.

Cette liste de critères est non exhaustive, il existe de nombreuses manières de caractériser une émulsion.

I.1.4. Divers types d'émulsions

I.1.4.1. Emulsion simple

Elles sont composées d'une phase lipophile, d'une phase hydrophile et d'un émulsifiant suivant que la phase continue est lipophile ou hydrophile, ou hydrophile, on définit deux types d'émulsions [10].

Tableau I.2: Deux types d'émulsions simples

Sens de l'émulsion	Phase dispersée	Phase dispersante	Symboles
Émulsion d'huile dans l'eau (Huile/Eau ; Oil/Water) =émulsion de type aqueux =émulsion à eau externe	Lipophile	Hydrophile	L/H, O/W, H/E
Émulsion d'eau dans l'huile (Eau/Huile ; Water/Oil) = émulsion de type huileux = émulsion à huile externe	Hydrophile	Lipophile	H/L, W/O, E/H

En fonction de la taille moyenne des gouttelettes on distingue des émulsions plutôt grossières, appelés émulsions ou macroémulsions et des émulsions plus fines, appelées mini ou nanoémulsions.

Tableau I.3: Taille moyenne de gouttelettes

Taille (µm)	Désignation
1 à 10	Macroémulsions ou émulsions
0,1 à 1	Miniémulsions ou nanoémulsions

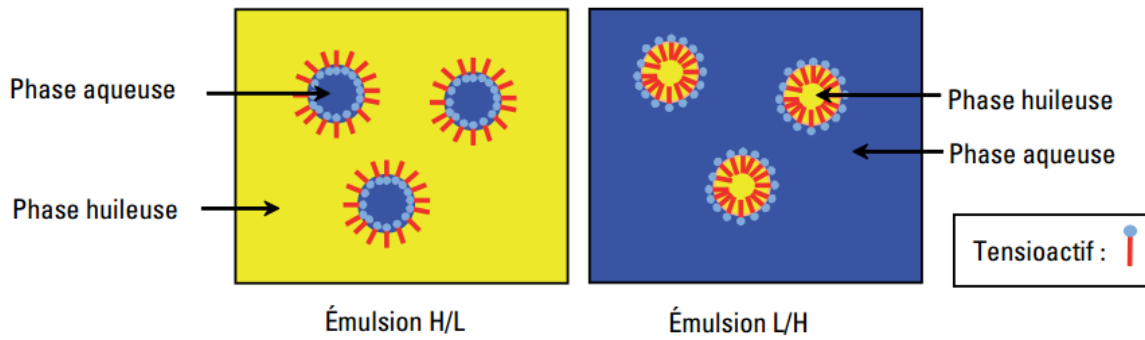


Figure I.1: Les deux types d'émulsions simple

I.1.4.2. Emulsions multiples

Il s'agit d'émulsions ou de dispersion d'une émulsion dans une phase dispersante:

- La dispersion d'une émulsion H/L dans une phase aqueuse (H) donne une émulsion triple H/L/H (ou E/H/E ou W/O/W);

-à l'inverse, la dispersion d'une émulsion L/H dans une phase huileuse(L) donne une émulsion L/H/L.

Ces deux exemples correspondent au cas le plus simple d'émulsions multiples : les émulsions doubles (figure I.2). La figure 4 présente une microphotographie d'émulsion H/L/H.

Les émulsions multiples sont surtout utilisées en pharmacie et en cosmétique. Leur formulation est plus complexe que celle des émulsions simples.

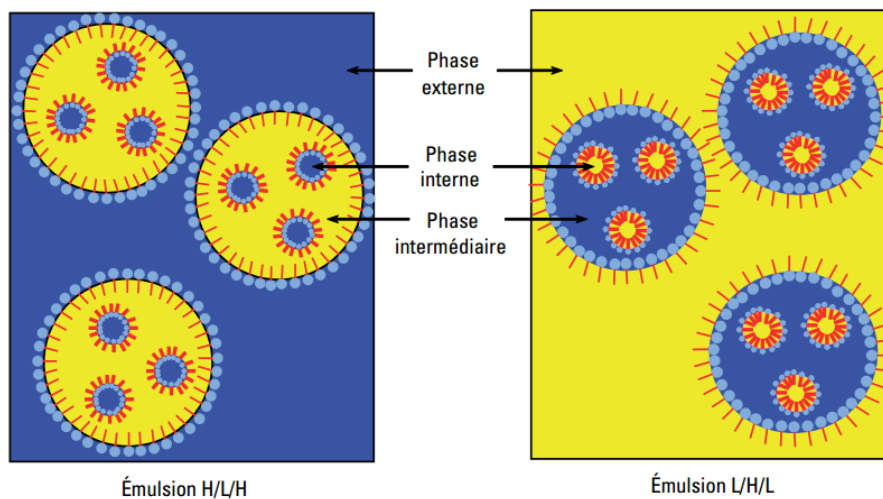


Figure I.2: Les deux types d'émulsions doubles

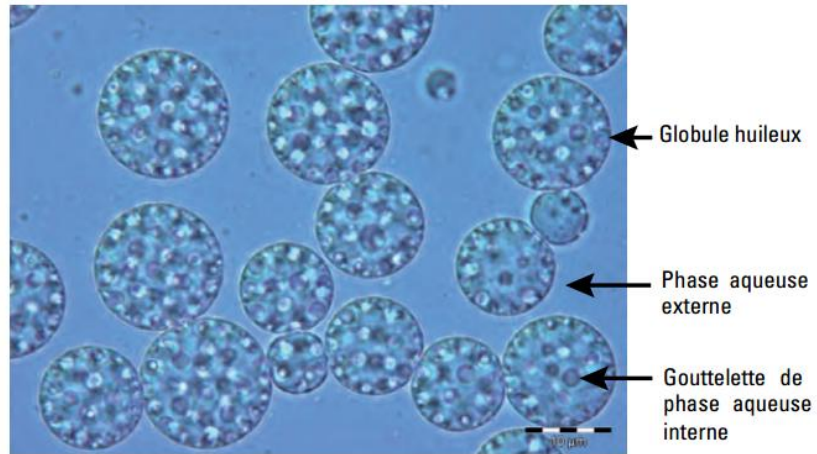


Figure I.3: Emulsion E/H/E observé au microscope optique à contraste de phase

1.1.5. Stabilité des émulsions

L'émulsification consiste essentiellement à produire une dispersion stable et homogène de deux liquides immiscibles. Cependant, ces systèmes sont souvent sujets à des mécanismes de déstabilisation pouvant être divisés en trois classes par :

- Des phénomènes conduisant à une augmentation de taille des gouttelettes : coalescence et mûrissement d'Ostwald.
- Des phénomènes liés à la migration des gouttelettes : crémage et floculation.
- Inversion de phase[12].

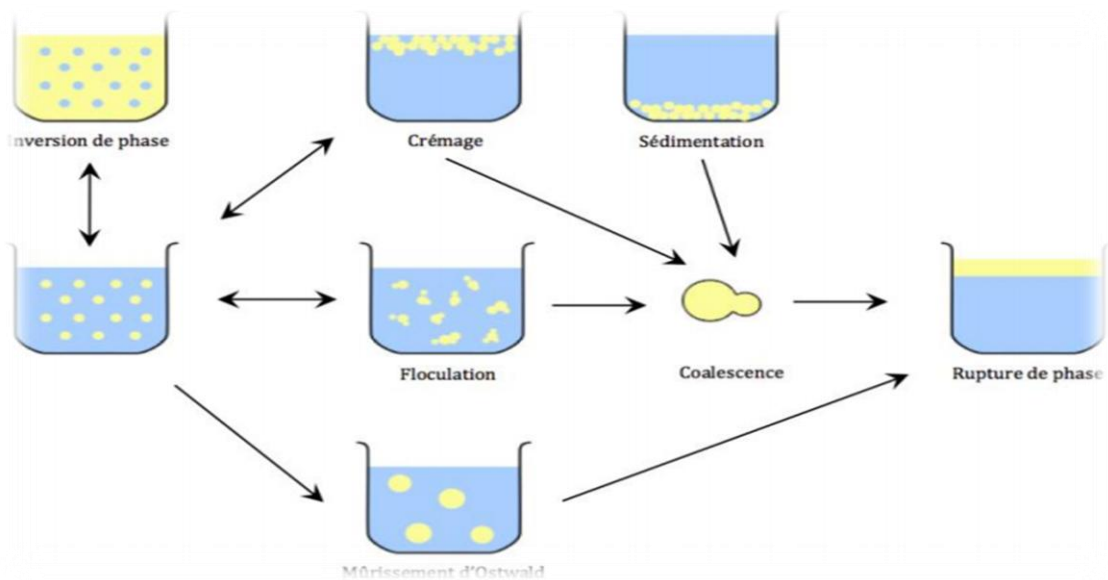


Figure I.4: Différentes phases d'instabilités d'une émulsion

I.1.6. Formulation d'une émulsion

La formulation d'une émulsion comprend de nombreuses étapes préliminaires afin de garantir sa stabilité. Différents paramètres pouvant varier au cours de la formulation[13, 14].

a- Variables de formulation

Il existe différentes variables pouvant influencer la formulation d'une émulsion :

- Variables physico-chimiques

Il s'agit de tous les paramètres physiques et chimiques comme la température, la pression, la nature des constituants, le type d'électrolytes et l'alcool.

- Variables de composition

Les variables extensives associées aux quantités et proportions en eau, en huile et en tensioactif.

- Variables mécaniques

Les variables associées au protocole d'émulsification comme l'ordre d'incorporation des composants, la géométrie du dispositif d'agitation et la vitesse d'agitation.

b- Etapes préliminaires

Avant de procéder à la formulation proprement dite, différentes étapes préliminaires, les unes liées aux autres, doivent être réalisées avec précision afin de minimiser au maximum les erreurs pouvant provoquer l'instabilité de la préparation.

- Choix du type d'émulsion

Il existe deux types d'émulsions qui varient en fonction de la nature de la phase dispersée et celle de la phase dispersante : il s'agit des émulsions huile dans eau (H/E) et eau dans huile (E/H). Cette première étape préliminaire consiste donc à choisir la nature de chacune des deux phases.

- Choix du tensioactif

Le choix du tensioactif sera donc de nouveau dépendant de l'usage que nous allons faire de la préparation à formuler

- Choix du protocole de formulation

Toutes ces étapes préliminaires sont liées entre elles et celle-ci ne déroge pas à la règle.

- Pour préparer une émulsion huile dans eau (H/E), l'eau est additionnée dans l'huile.
- Pour préparer une émulsion eau dans huile (E/H), l'huile est additionnée dans l'eau.
- Lorsque les constituants sont à l'état liquide à température ambiante, le mélange est chauffé à 75°C ;
- Lorsque certains composants sont à l'état solide à température ambiante, le mélange est chauffé à une température supérieure de 10°C par rapport à celle du point de fusion le plus élevé des composants de l'émulsion.

Enfin, l'agitation doit se faire en fonction de l'état de la phase lipophile. Plus cette dernière est visqueuse, plus l'agitation à fournir doit être élevée.

I.2. Les biosurfactants, un intérêt biotechnologique

I.2.1. Généralités sur les surfactants

I.2.1.1. Définition

Les surfactants (anglais "**Surface Active Agents**") sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire (tête) et d'une partie hydrophobe non polaire (queue) (figure I.5). Ils agissent préférentiellement à l'interface entre deux phases fluides telles que l'interface air/eau ou huile/eau. Cette propriété permet aux surfactants d'être capables de réduire les tensions de surface et inter faciales et les rendre ainsi un excellent agent détergent, émulsifiant, dispersant et moussant[15].

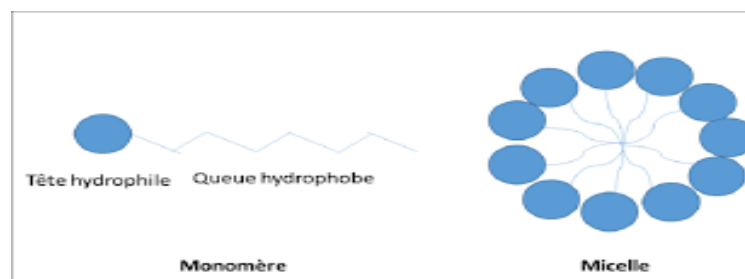


Figure I.5: Représentation schématisé d'un surfactant, sous forme d'un monomère et micelle

En raison de sa nature amphiphile, une molécule de surfactant peut se dissoudre dans l'eau sous forme de monomère. Il s'adsorbe à l'interface ou il est incorporé avec d'autres molécules de surfactant dans le cadre de la formation d'une micelle. Lorsque la concentration en

surfactant est inférieure à une concentration spécifique, les molécules du surfactant existent principalement sous forme de monomères. La concentration à partir de laquelle les monomères commencent à former ces agrégats est définie comme la concentration micellaire critique (CMC).

Cette propriété particulière confère alors aux émulsifiants une capacité à se placer préférentiellement entre l'huile et l'eau (interface). Ainsi dans une émulsion, les émulsifiants vont se placer tout autour des gouttelettes et l'émulsion va ainsi gagner en stabilité (figure I.6).

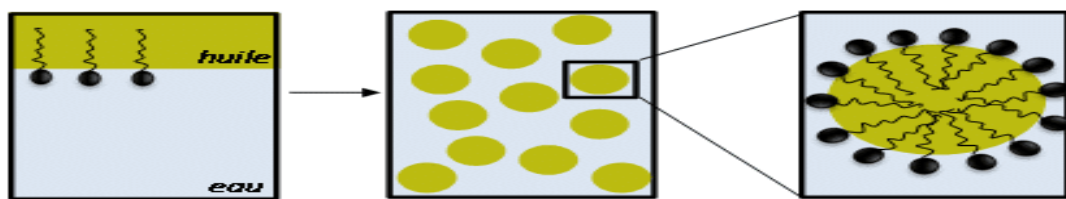


Figure I.6: Représentation schématisée des émulsifiants à l'interface huile/eau et autour des gouttelettes

I.2.1.2. Classification des surfactants

Le classement le plus couramment utilisé des surfactants est basé sur la nature de la tête hydrophile et selon lequel on distingue quatre grandes classes :

1. Les cationiques qui possèdent une charge positive;
2. Les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement;
3. Les non ioniques, sans charge ;
4. Les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents : l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre[16].

La partie hydrophobe des surfactants est constituée d'une chaîne hydrocarbonée, linéaire ou ramifiée de 8 à 18 atomes de carbone[17]. Elle influe sur la chimie du surfactant par son aromaticité, son nombre d'atomes de carbone ou son degré de ramification[18].

Le degré de ramification, la position du groupement hydrophile et la longueur de la chaîne hydrocarbonée sont autant des paramètres importants dans la spécification des propriétés physicochimiques des surfactants[19].

I.2.1.3. Mode d'action d'un surfactant

En émulsion, les parties hydrophile et hydrophobe du tensioactif (émulsifiant) ont de l'affinité respectivement pour la phase hydrophile et hydrophobe de l'émulsion.

Généralement l'émulsifiant peut agir sur la stabilité d'une émulsion de trois façons :

1. Soit en diminuant la tension inter faciale entre les deux liquides, donc augmentation de la surface de séparation c'est le cas des surfactifs dont les molécules viennent former un film à l'interface. Cette propriété est responsable des phénomènes de mouillage, de dispersion, de détergence et d'émulsification.
2. Soit en augmentant la viscosité de la préparation, cas d'une gomme par exemple.
3. Soit en agissant à la fois sur la tension inter faciale et sur la viscosité, c'est ce qui se produit lorsqu'on met un surfactif non-ionique en grosse excès; une partie agit à l'interface pour baisser la surface inter faciale et l'autre augmente la viscosité de la phase aqueuse dispersante.

I.2.2. Biosurfactants

I.2.2.1. Définition

Les biosurfactants sont définis comme étant des molécules amphiphiles produites par des microorganismes (bactéries, champignons et levure) avec une activité particulière de surface élevée et une capacité d'émulsifiante importante[20,21,22].

En termes de propriétés de surface, un biosurfactant efficace diminue la tension de surface entre l'eau et l'air de 72 à 35 mN/m et les tensions interfaciales entre l'eau et l'hexadécane de 40 à 1 mN/m[23].

Les biosurfactants existent rarement en tant que composés cationiques (sauf ceux qui contiennent un groupe amine), mais souvent comme molécules anioniques ou non ioniques [19]. Ils ont l'avantage d'être moins ou non toxiques et biodégradables. Leur problème majeur réside dans leur coût de production assez élevé. L'orientation actuelle vers une industrie

durable qui respecte l'environnement exige le retour à des biosurfactants afin de remplacer quelques surfactants chimiques[18].

I.2.2.2. Classification des biosurfactants

Contrairement aux tensioactifs chimiques, les biosurfactants sont généralement classés principalement par leur composition chimique et leur origine microbienne[24]. Les biosurfactants couvrent donc une vaste gamme de poids moléculaires [25]. Les biosurfactants sont classés selon leur composition chimique, la masse moléculaire, les propriétés physico-chimiques et le mode d'action et d'origine microbienne[26, 21].

2.1. Selon le poids moléculaire

a. Faible poids moléculaire

Il comprend des molécules ou des composés appelés biosurfactants qui peuvent réduire efficacement la tension superficielle et inter faciale, tels que les glycolipides dans lesquels les glucides sont liés à un acide aliphatique à longue chaîne, lipopeptides, phospholipides.

b. Haut poids moléculaire

Ils sont appelés collectivement bio-émulsines ou des bioémulsifiants qui se lient étroitement aux surfaces. Ces derniers sont des polymères amphiphiles et polyphiles qui sont généralement plus efficaces dans les émulsions stabilisantes l'huile dans l'eau, tel que les polysaccharides, lipopolysaccharides des protéines ou lipoprotéines[27].

2.2. Selon la structure chimique

Les biosurfactants sont classés suivant la nature biochimique du surfactant produit par le micro-organisme. On distingue Cinq grandes classes de biosurfactants : les glycolipides, les lipopeptides, les phospholipides, les lipopolysaccharides et les lipides neutres[28].

a. Glycolipides

Les glycolipides sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acide aliphatique ou d'acide hydroxylaliphatique. Les glycolipides les plus étudiés sont : les rhamnolipides, les lipides tréhalose et les sophorolipides[26].

b. Lipopeptides et lipoprotéines

Les lipopeptides sont particulièrement intéressants en raison de leurs activités de surface élevées [29] et de leur potentiel antibiotique contre diverses bactéries, algues, champignons et virus. Ceux-ci consistent en un lipide attaché à une chaîne polypeptidique[28]. Parmi ces biosurfactants les plus puissants est la surfactine (lipopeptide cyclique) produit par *Bacillus subtilis*.

c. Acides gras, phospholipides et lipides neutres

Plusieurs bactéries et levures produisent de grandes quantités d'acides gras et de tensioactifs phospholipidiques au cours de la croissance sur *n*-alkanes[30]. La balance hydrophile-lipophile (HLB) est directement liée à la longueur de la chaîne hydrocarbonée dans leurs structures. La souche *Acinetobacter*sp.HO1-N produit le phosphatidyléthanolamine[26], qui forme des micros émulsions optiquement claires des alcanes dans l'eau. Le phosphatidyléthanolamine produit par *Rhodococcuserythropolis* cultivée sur *n*-alcanes provoque un abaissement de la tension interfaciale entre l'eau et l'hexadécane à moins de 1mNm^{-1} et une concentration micellaire critique (CMC) de 30 mg/l[31].

d. Biosurfactants polymériques

Les biosurfactants mieux étudiés se sont les polymères : Emulsan, liposan, alasan, lipomanan et d'autres complexes polysaccharides-protéines. *Acinetobactercalcoaceticus*RAG-1 produit un bioémulsifiant efficace poly anioniques hétéropolysaccharide[32].Emulsan est un agent émulsifiant efficace, pour les hydrocarbures dans l'eau,[33] à des concentrations faibles allant de 0,001 à 0,01%. Le liposan, composé de 83% glucides et 17% protéines, est un émulsifiant d'eau soluble synthétisé par *Candida lipolytica*[32].

e. Biosurfactants particuliers

Les biosurfactants particuliers jouent un rôle important dans l'absorption d'alcanes par les cellules microbiennes. Les vésicules produites par la souche *Acinetobacter*sp. HO1-N ont un diamètre de 20-50 nm et une densité de flottaison de $1,158\text{ g/cm}^3$, ils sont composés de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharide[30].

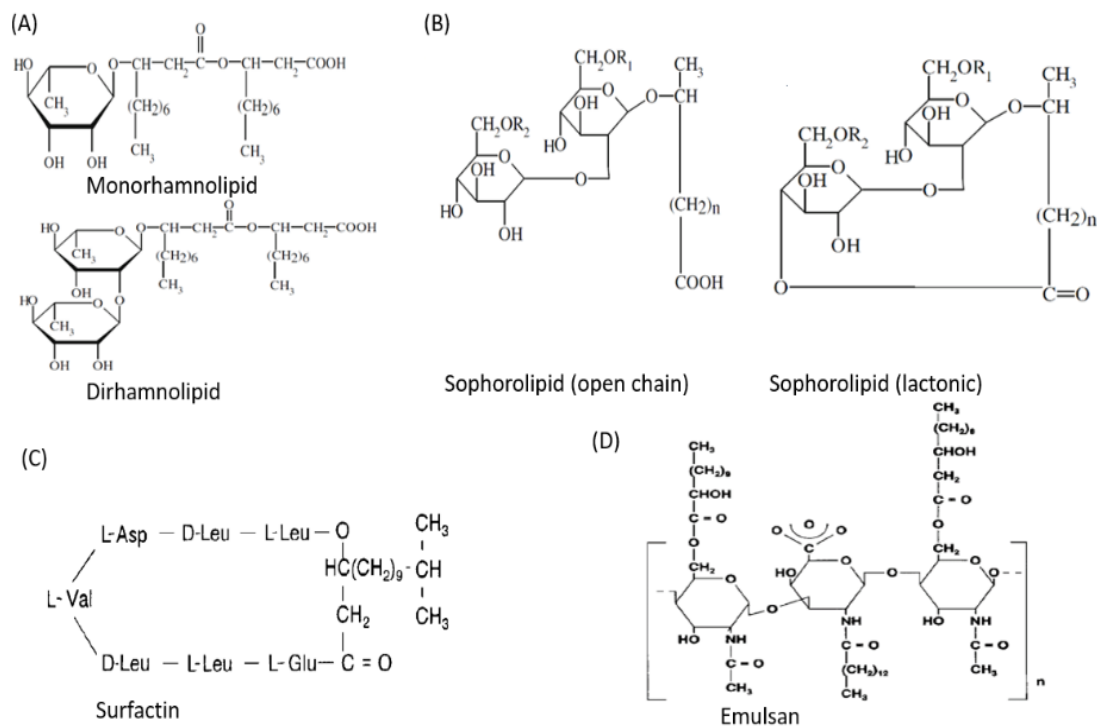


Figure I.7: Structure chimique de A) Monorhamnolipides et Dirhamnolipides, B) Sophorolipide (chaîne ouverte) et Sophorolipide Sophorolipides (lactonique), C) Surfactine, D) Emulsan

I.2.2.3. Microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes, notamment les bactéries, se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme les glucides, les huiles, les hydrocarbures et même les déchets agroalimentaires[34, 35]. Cependant, la plupart des biosurfactants sont synthétisés par des microorganismes croissant sur des substrats hydrophobes, principalement les alcanes linéaires et les huiles (olive et végétale)[36]. Ils peuvent s'adhérer à la surface cellulaire, comme ils peuvent être libérés dans le milieu de culture[37, 5].

Les microorganismes producteurs de biosurfactants sont en généralement isolés à partir des sites contaminés (eau de mer douce et eau souterraine), milieux terrestres (le sol, les sédiments et les boues) par des substances hydrophobes comme le pétrole et ses dérivés [38, 39]. Le tableau I.4 donne quelques microorganismes producteurs de biosurfactants.

Tableau I.4: Microorganisme producteurs de biosurfactants[2;40]

Type de biosurfactants	Microorganisme producteur
Glycolipides	
Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Tréhaloses lipides	<i>Rhodococcus erythropolis, Arthrobacter sp.</i>
Sophorolipides	<i>Candida bombicola. Candida apicola</i>
Mannosylerythritol lipides	<i>Candida antarctica</i>
Lipopeptides	
Surfactine/ Iturine/ Fengycine	<i>Bacillus subtilis</i>
Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Lichenysine	<i>Bacillus licheniformis</i>
Serrawettine	<i>Serratiamarcescens</i>
Phospholipides	<i>Acinetobacter sp., Corynebacterium lepus</i>
Acides gras/ Lipides neutres	
Acide corynomicolique	<i>Corynebacterium insidibasseosum</i>
Biosurfactants polymériques	
Emulsane	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Alasane	<i>Acinetobacter radioresstens</i>
Liposane	<i>Candida lipolytica</i>
Lipomanane	<i>Candida tropicalis</i>
Biosurfactants particuliers	
Vesicules	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Paroi des cellules microbiennes	<i>Cyanobacteria</i>

I.2.2.4. Production de biosurfactants

Il existe plusieurs facteurs impliqués dans la synthèse des biosurfactants qui affectent leur taux de production et leurs propriétés. Les facteurs qui affectent de manière significative la production optimale de biosurfactant sont les sources de carbone solubles/insolubles dans l'eau (par exemple, le glycérol, le glucose, le mannitol et l'huile d'olive) ; sources d'azote (par exemple, sels d'ammonium et urée); pH, température, rapport carbone/azote (C/N), agitation et disponibilité en oxygène[41, 42, 43, 44, 45].

Les biosurfactants sont produits par un groupe diversifié de microorganismes, principalement les bactéries, les champignons et les levures. La quantité de biosurfactants produits dépend du type de microorganismes et de leurs sources. De nombreux microorganismes utilisés dans l'application industrielle pour l'élimination des déchets ont été isolés à partir de sols contaminés, d'effluents et de sources d'eaux usées au point de rejet. Ainsi, ils ont la capacité de se développer sur des substrats qui sont considérés comme potentiellement nocifs pour d'autres microorganismes non producteurs de biosurfactants.

Il existe une grande variété de biosurfactants microbiens. Leur type, leur quantité, et leur qualité sont principalement influencés par la nature du substrat carboné et par la concentration en azote, phosphore, magnésium, fer et manganèse dans le milieu et les conditions de culture, qui comprennent le pH, la température, l'agitation, le taux de dilution, etc [46].

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insoluble dans l'eau et la réduction de la tension superficielle du milieu ainsi que la formation d'une émulsion stable indique une production efficiente[47]. La présence de surfactant est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscible[48].

4.1. Les facteurs affectant la production des biosurfactants

Mulligan et al(2014)[49]ont précisé que certain nombre d'études ont indiqué que le type et le rendement du biosurfactant est influencé par le type de milieu (source de carbone et autres nutriments) et les conditions de croissance (température, agitation, pH, etc.), donc l'optimisation de la production des biosurfactants affectant par déverse facteurs nutritionnels et facteurs environnementaux comme suivant :

4.1.1. Facteurs nutritionnels

Sources de carbone, d'azote et de phosphate, ions métalliques et autres additifs utilisés dans la formulation du milieu jouent un rôle crucial dans la production et le rendement des biosurfactants[50].

a. Source de carbone

La sources de carbone est extrêmement importante et a été citée comme un paramètre très influençant sur la nature et le rendement de la production de biosurfactants. Deux types de sources de carbone peuvent être différenciés :

- Les sources insolubles et les sources solubles. Les sources insolubles sont principalement les huiles végétales les graisses animales, les effluents pétroliers, les effluents des moulins à huile d'olive, la pâte à savon, la mélasse et les déchets pétroliers, les hydrocarbures, des mélanges hydrophobes (tels que l'huile de moteur, le diesel, le pétrole brut).
- Les substrats solubles quant à eux peuvent être différents sucres simples (glucose), du glycérol et le lactosérum lactique.

Le coût élevé de la production de biosurfactants est principalement dû au prix des matières premières nécessaires pour la production. Afin de remédier à ce problème, l'utilisation de sources de carbone secondaires, notamment de produits résiduels de l'industrie agro-alimentaire, est de plus en plus étudiée [51].

b. Sources d'azote

Différentes sources d'azote organique et inorganique ont été utilisées dans la production de biosurfactants par des micro-organismes. Dans les processus fermentaires, le rapport C/N affecte l'accumulation de métabolites. Lorsque les niveaux d'azote faible les rapports C/N élevés limitent la croissance bactérienne et favorisant le métabolisme cellulaire vers la production de métabolites. Un excès d'azote conduit à la synthèse de matériel cellulaire et limite l'accumulation de produits[52].

c. Effet d'autres facteurs/sources

L'influence de divers nutriments ou suppléments nutritionnels sur la production de biosurfactant ne peut être exclue. La croissance et la production de biosurfactants sont affectées considérablement par la quantité de phosphate, de fer, de manganèse, de calcium et d'oligo-éléments dans le milieu[53]. En outre, le rendement de la production de biosurfactants est fortement amélioré ou inhibé par l'ajout des antibiotiques tels que la pénicilline ou le chloramphénicol[54].

4.1.2. Facteurs environnementaux

Il existe de nombreux rapports scientifiques où les effets individuels de la disponibilité en du pH, la température, oxygène, agitation et de la salinité sur la production de biosurfactants ont été examinées[55].

a. Le pH

Le pH est également un facteur environnemental important et influe sur la stabilité et la solubilité des métabolites[56]. Généralement, le milieu acido-basique est défavorable lorsque la productivité des biosurfactants. Chez les souches de *P. aeruginosa*, la production de biosurfactants est maximale dans la gamme de pH de 6,0 - 6,5. Cependant, leur production chute rapidement à des pH inférieurs ou supérieurs.

b. Température

L'activité d'émulsification et la tension superficielle du biosurfactant qui produit par les souches thermophiles tout au long de la plage de température supérieures à 40°C est restées constantes après autoclavage à 120°C pendant 20 min[52].

c. L'oxygène

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production de biosurfactants à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance, l'étude des effets synergiques sur *Lactobacillus pentosusa* reflète l'interdépendance de ces facteurs. Dans le cas de *B.subtilis*C9, un rendement trois fois plus élevé en lipopeptides a été observé dans des conditions limitées en oxygène par rapport à des conditions suffisantes en oxygène[54].

d. Agitation

Pour les souches bactérienne, l'augmentation de la vitesse d'agitation des milieux de cultures induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. Par contre chez les levures l'effet inverse est observé[57].

e. Salinité

La concentration en sels influence la production de certains biosurfactants. Cependant, des concentrations supérieures à 10% n'affectant pas leur production, bien qu'il soit observé une légère diminution sur la concentration micellaire critique[58].

1.2.2.5. Propriétés des biosurfactants

Une compréhension des propriétés physicochimiques des biosurfactants est nécessaire pour leur application pratique réussie. L'origine et les processus de production/purification des biosurfactants influençant fortement leurs caractéristiques moléculaires et le comportement interfacial qui en découle, il est nécessaire de développer des connaissances autour de

l'interaction de ces facteurs y compris la tension de surface et interfaciale, la biodégradabilité, la faible ou non-toxicité stabilité dans des conditions extrêmes de température, pH et salinité, etc[59, 60, 2]

a. Activité superficielle et interfaciale

Les biosurfactants, produisent une tension superficielle plus faible à une concentration plus faible, démontrant une efficacité et une efficacité supérieure à celles des surfactants conventionnels sont des caractéristiques essentielles d'un bon surfactant.

b. Tolérance à la température, au pH et à la force ionique

Les biosurfactants peuvent être utilisés dans des conditions extrêmes.

c. Biodégradabilité

Les biosurfactants sont facilement dégradés par les microorganismes dans l'eau ou le sol, ce qui les rend appropriés pour les applications de biorestauration et le traitement des déchets.

d. Faible toxicité

A cause de leur faible toxicité, les biosurfactants permettent leur utilisation dans divers produits notamment alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

e. Biocompatibilité et digestibilité

Qui permettent l'application de biosurfactants dans les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques.

f. Disponibilité

Les biosurfactants peuvent être produits à partir de matières premières peu coûteuses et disponibles en grande quantité ou des déchets industriels. La source de carbone peut provenir d'hydrocarbures, de glucides et/ou de lipides, qui peuvent être utilisés séparément ou en combinaison les uns avec les autres[48].

I.2.2.6. Applications émergentes des biosurfactants

Les faibles valeurs de CMC, la capacité à réduire la tension superficielle/interfaciale et les propriétés d'émulsification des biosurfactants peuvent les rendre plus adaptés à certaines applications commerciales que leurs homologues synthétiques. Une sensibilisation accrue à

l'environnement et les progrès de la biotechnologie peuvent faire augmenter la demande des consommateurs pour l'utilisation de biosurfactants dans de nouveaux produits, en raison de leur biodégradabilité et de leur faible toxicité. Parmi des nombreux domaines d'application prometteurs des biosurfactants, on peut citer : la récupération métabolique assistée du pétrole, l'élimination de la contamination par les métaux lourds, la bioremédiation, l'agroalimentaire, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques, la biomédecine et la nanotechnologie[55, 61, 62, 63].

***Biomédical**

Au cours de la dernière décennie, l'utilisation des biosurfactants dans le domaine médical ont augmenté. En font des molécules pertinentes comme agents thérapeutiques présentant des activités antibactériennes, antifongiques et antivirales pour des applications dans la lutte contre de nombreuses maladies infectieuses, le soin et la santé publique et sans utilisation de drogues synthétiques et de produits chimiques[64].

*** Bioremédiation**

La bioremédiation implique l'accélération des processus biodégradables naturels dans les environnements contaminés par les hydrocarbures, les polluants organiques et les métaux lourds et dans le traitement des eaux usées en améliorant la disponibilité des matériaux[65].

*** Chélation des métaux lourds**

Les biosurfactants anioniques ont la capacité à former des complexes avec des métaux (métal-biosurfactant) pour augmenter la tolérance des bactéries aux métaux lourds pour la biorestoration des sols contaminés par des métaux lourds. Ces complexes sont désorbés de la matrice du sol vers la solution du sol en raison de la baisse de la tension interfaciale. Les micelles des biosurfactants peuvent se lier aux métaux qui mobilisent les métaux dans l'eau[55].

*** Industries alimentaires**

Les biosurfactants sont utilisés comme émulsifiants dans le traitement des matières premières, dans la viande et dans la vinaigrette[67] et comme additifs alimentaires, utilisés aussi dans l'amélioration de la stabilité de la pâte, du volume, de la texture et de la conservation des produits de boulangerie est obtenue par l'ajout de surfactants rhamnolipides[58].

*** L'agriculture**

Les biosurfactants peuvent être utilisés pour éliminer les agents pathogènes des plantes et pour augmenter la biodisponibilité des nutriments pour les microbes associés aux plantes bénéfiques. Jouant le rôle d'antagonistes empêchant la propagation des zoospores dans les systèmes de culture sans sol (l'hydroponique) [67]. Ils peuvent être largement appliqués pour améliorer la qualité des sols agricoles par l'assainissement des sols [68].

I.2.2.7. L'application des biosurfactants est avantageuse dans le secteur alimentaire

Dans l'industrie alimentaire, les biosurfactants peuvent être utilisés pour le nettoyage et/ou le traitement des surfaces de contact, agissant comme agents antimicrobiens et antibiofilm, et peuvent également être incorporés directement dans les formulations en tant qu'additif ou ingrédient [69,8]. L'utilisation de biosurfactants comme additifs alimentaires s'inscrit dans l'intérêt croissant des consommateurs pour les aliments naturels nécessitant le développement de biomolécules aux propriétés technologiques capables de réduire voire de supprimer l'utilisation de tensioactifs synthétiques [70].

La capacité d'émulsification est une autre propriété très intéressante de ces biomolécules pour les produits alimentaires. Les biosurfactants ont très souvent une capacité émulsifiante, mais les bioémulsifiants ne réduisent pas nécessairement la tension superficielle [71].

L'incorporation de biosurfactants a été explorée dans plusieurs formulations, ce qui a conduit à la nécessité d'identifier de nouveaux composés tensioactifs produits par différents microorganismes cultivés avec des déchets afin de réduire les coûts de production [72,73]. Les biosurfactants sont également efficaces pour solubiliser les huiles végétales, stabiliser les graisses pendant les processus de cuisson et améliorer les propriétés organoleptiques du pain. Les biomolécules peuvent être utilisées dans les formulations de crèmes glacées [74], les muffins (comme ingrédient pour remplacer la levure chimique et les œufs) [75], les cookies (pour remplacer les additifs synthétiques ; [76]) et les vinaigrettes et mayonnaises (comme émulsifiant ; [61,77]). Dans les aliments farineux, l'utilisation d'émulsifiants d'origine microbienne a émergé pour réduire l'utilisation des émulsifiants actuellement commercialisés et améliorer la rhéologie des produits [78].

Le biosurfactant peut être un bon substitut du jaune d'œuf pour réduire la quantité de graisse animale dans les aliments. Malgré l'augmentation significative de la teneur en lipides avec le

remplacement total du jaune, la présence d'acides gras dans la structure hydrophobe du biosurfactant favorise cette incorporation. De plus, le jaune d'œuf, en plus de contenir du cholestérol, des graisses saturées et des triglycérides, peut contenir des substances potentiellement toxiques, telles que des oligo-éléments et des métaux lourds, qui, à des concentrations élevées, peuvent provoquer une dépression, une hypertension, un cancer gastro-intestinal et la maladie d'Alzheimer [79, 80]. En revanche, un biosurfactant peut avoir des effets bénéfiques contre les maladies cardiovasculaires, car il contient des graisses monoinsaturées dans sa structure [81]. Malgré les propriétés attractives des biosurfactants, les coûts de production élevés de ces biomolécules restent un goulot d'étranglement technologique, comme c'est le cas pour la plupart des produits biotechnologiques. D'autre part, le marché de consommation actuel s'intéresse de plus en plus à l'utilisation d'ingrédients alimentaires plus sains, ce qui pousse la recherche et l'optimisation des procédés de production et d'extraction de ces biomolécules afin de les rendre plus compétitifs en tant qu'additifs alimentaires.

I.2.8. Conclusion

Les biosurfactants sont synthétisés par les microorganismes (notamment les hydrocarbonoclastes) en utilisant plusieurs sources de carbone. Afin de réduire le coût de production, les recherches actuelles s'intéressent de plus en plus à la production de biosurfactants en utilisant des substrats non conventionnels à savoir divers sous-produits agricoles et déchets industriels. Les caractéristiques fonctionnelles et écologiques des biosurfactants permettent leur exploitation dans divers domaines. Leurs applications dans le domaine alimentaire restent moins étudiées, cependant l'intérêt croissant des consommateurs pour les aliments naturels nécessitant le développement de biomolécules aux propriétés technologiques capables de réduire voire de supprimer l'utilisation de tensioactifs synthétiques.



CHAPITRE II
MATERIELS ET
METHODES

II.1. Isolement des souches bactériennes

Toutes les étapes de l'isolement ont été réalisées dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Recherche des Substances Naturelles et Biomolécule (Université Blida 1). Deux biotopes ont été ciblés pour l'isolement :

- Sédiment (Port de pêche de Khemisti, Tipaza)
- Les algues rouges et brunes : zone du complexe Corne d'or Tipaza

Les différentes étapes de l'isolement sont regroupées dans l'annexe (Beichi, 2021 ; Saidani, 2021 ; Doctorante Hadjalah)[82,83].

II.2. Criblage des souches productrices de biosurfactants

C'est une sélection d'une souche bactérienne performante à partir d'un lot de souches données, sur un critère de choix. Dans notre étude, nous avons ciblé sept (07) souches bactériennes marines pour la production de biosurfactants à caractère émulsifiant : deux souches isolées à partir de sédiment (numérotées : SH12 et SH7) et 5 souches isolées à partir des algues marines (codées : BS1, BS2, BS3, BS4, BS5).

Cette sélection est basée sur les tests suivants : la croissance microbienne (DO à 600 nm), la tension de la surface (TS), le déplacement de pétrole (DDP) et l'activité émulsifiante (E24).

II.3. Repiquage des souches et préparation des précultures

Repiquage: Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ont été repiquées et ensemencées sur milieu solide (Gélose nutritif) en boîtes de Pétri. Après l'incubation à 30°C pendant 24 heures, les souches sont conservées à 4 °C.

Préculture: La préculture a été effectuée dans un milieu Luria-Bertani (LB) liquide 1L dont la composition (g/l) est : 10 g de peptone, 5 g de l'extrait de levure et 10 g de Na Cl. Après l'ajustement du pH avec NaOH à $7,0 \pm 0,2$. Le milieu LB ainsi préparé est stérilisé par autoclavage à 120 °C pendant 20 min. Les précultures ont été obtenues par incubation à 30°C pendant 24h et sous agitation (200 tr/min).

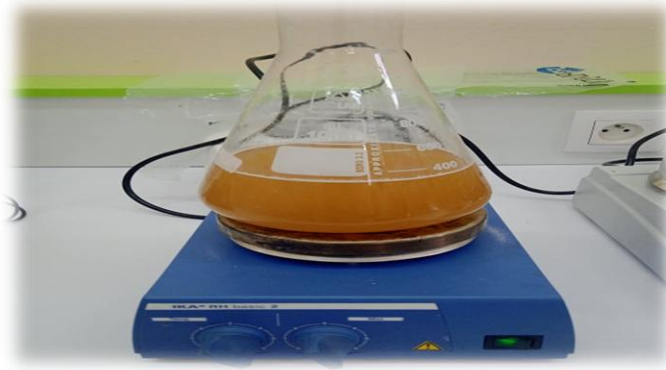


Figure II.8: Préparation du milieu Lauria Bertani

II.4. Milieu de production

Le milieu de culture utilisé est à base de sels minéraux (milieu minimum, MM), sa composition (g/l) est : $\text{KH}_2\text{PO}_4(1)$, $\text{K}_2\text{HPO}_4(0.2)$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}(0.2)$, $\text{CaCl}_2(0.02)$, $\text{NH}_4\text{NO}_3(1)$, $\text{Na Cl}(10)$, $\text{FeCl}_3(60\% \text{ } 60\text{g} / 100\text{ml} \text{ eau ; } 20 \text{ microlitres})$. Après l'ajustement du pH à $7,0 \pm 0,2$, le milieu est autoclavé à $120 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 20 min.



Figure II.9: Préparation du milieu minimum

II.5. Production de biosurfactant

Le milieu de culture MM est ensemencé de 2 % de la préculture, la source de carbone et d'énergie utilisée était l'huile d'olive à raison de 1 %. Ces expériences ont été réalisées dans

des flacons de volume 500ml contenant 100ml de milieu. L'incubation s'effectue à 30°C sous agitation 200 tr/min pendant 72 heures pour le milieu.

II.6. Centrifugation et filtration

Après 72 heures d'incubation à 30°C sous agitation du milieu de production, Le milieu de culture est centrifugé pendant 30 min à 4°C (4500 tr/min) afin de séparer le surnageant de la biomasse. Ensuite, on passe à la filtration à l'aide d'un papier filtre WATTMAN en récupérant le biosurfactant dans le filtrat (surnageant).



Figure II.10: Appareil de centrifugation



Figure II.11: Filtration

II.7. Technique de détection de la production de biosurfactant

La mesure de la production de biosurfactant est estimée par la croissance bactérienne (DO) la tension de surfaces, test de déplacement de pétrole et l'activité émulsifiante (E24). Le surnageant est récupéré par centrifugation à 6000 tr/min pendant 20 min, puis filtré sur papier filtre ordinaire.

a. Test de déplacement de pétrole (DDP)

Ce test est défini comme un test qualitatif de criblage des souches productrices de biosurfactants facile à réaliser, simple, sensible et reproductible est basé sur la caractéristique des biosurfactants à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau. Les protocoles ont été préparés comme suivant: sur des boîtes de Pétri contenant 40 ml d'eau distillée, un volume de 100 µl de pétrole brut est étalé sur toute la surface de l'eau. Par la suite, 20 µl de surnageant ont été déposés doucement au centre de la couche de pétrole, entraînant la formation d'un

halo claire. Le diamètre du cercle ainsi formé est mesuré en cm après 30 secondes[84]. Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactant est importante.

b. Mesure de la Tension de surfaces(TS)

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

Vingt (20)ml de culture ont été prélevés et centrifugés (4000tr/min pendant 30min à 4°C).Le surnageant de culture est filtré à travers un papier filtre WATTMAN avant d'effectuer la mesure de la tension de surface.

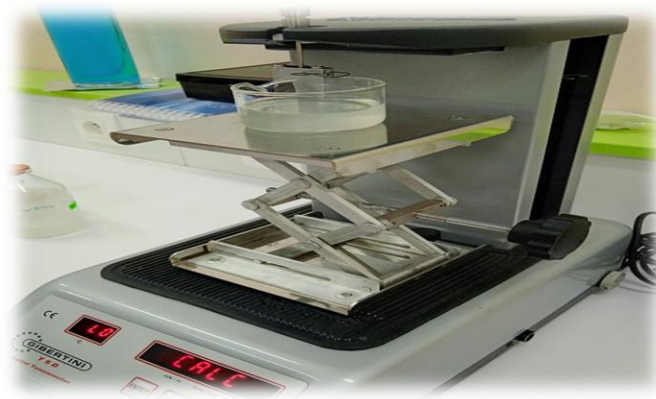


Figure II.12:Appareille de mesure de la tension de surface(TS)

c. Test d'indice d'émulsification (E24)

D'après **Bezza et Chirwa (2016)[85]**, l'activité d'émulsification a été mesuré par l'addition deux volumes identiques (2 ml chacun) d'un composé hydrophobe (huile d'olive / végétale) et du surnageant dans un tube à essai avec bouchon à vis. Le mélange est ensuite agité au vortex pendant 2 min puis laisser au repos pendant 24 h. L'activité d'émulsification est définie par l'indice d'émulsification (E24) qui définit comme étant le rapport de la hauteur mesurée de la couche d'émulsion et la hauteur totale du mélange. L'équation suivante a été exprimée en pourcentage :

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

Où

He : c'est la hauteur de l'émulsion (mm),

Ht : c'est la hauteur totale (mm).

Une comparaison entre les émulsions formées par rapport au témoin (eau distillé) doit être réalisée.

La capacité de maintenir au moins 50 % du volume initial de l'émulsion après 24 h de sa formation est considéré comme un critère cité pour confirmer la production des émulsifiants[86].

II.8.Cinétique de production du biosurfactant

La cinétique de production de biosurfactant de la souche productrice dans le MM (dans les conditions optimisées) a été suivie pendant sept jours. La réduction de la TS et la croissance bactérienne ont été suivies parallèlement afin de déterminer la phase de croissance adéquate pour la synthèse de biosurfactant.

- **Mesure de la densité optique (DO)**

Le suivi de la croissance bactérienne est opéré au moyen d'un spectrophotomètre UV-Visible RAYLEIGH (UV-2601) par la mesure de la densité optique (DO₆₀₀). Pratiquement, Un volume de 2 mL de culture est prélevé, aseptiquement après homogénéisation du milieu et régulièrement (chaque jour), dans des tubes eppendorfs. Le bouillon est centrifugé à une vitesse de 4500 tr/min pendant 10 min. Le culot bactérien est récupéré puis remis dans l'eau distillé vortexé pendant de 2 min avant de prendre la mesure de la DO à 600 nm [87].

Après cette étape de criblage, la meilleure souche bactérienne ayant une croissance maximale sur l'huile d'olive traduite par un trouble blanc savonneux, DDP, TS et E 24 est retenue pour la suite du travail.

II.9. Optimisation des facteurs de la production

II.9.1 Influence de la source de carbone

Trois sources de carbone de concentration 1% (v/v) ont été utilisées : huile d'olive, pétrole brut et gasoil. Les substrats ont été stérilisés sur un filtre 0,22 μm .

II.9.2 Influence de la source d'azote

Trois sources d'azote de concentration de 0,4 g/L ont été évaluées avec la meilleure source de carbone. Il s'agit de chlorure d'ammonium (NH_4Cl), de nitrate de potassium (KNO_3), et de nitrate d'ammonium (NH_4NO_3). Ces composés ont été stérilisés séparément sur filtre seringue (0,22 μm).

II.9.3 Influence de la salinité

L'effet de la salinité a également été étudié. En effet, le chlorure de sodium (NaCl) a été ajouté au MM (avec les paramètres optimisés) à différentes concentrations : 0 ; 10 ; 30 g/L NaCl .

II.10. Récupération du biosurfactant

Après trois jours de culture et lorsque la production de biosurfactant est maximale dans le milieu (vérification par TS et DDP), le volume entier de la culture est éliminé de la biomasse par centrifugation à une vitesse de 4500tr/min pendant 30 min à 4°C, suivi par une filtration sur papier filtre ordinaire. Le surnageant ainsi obtenu correspond au biosurfactant brut est partiellement purifié en suivant deux étapes :

- le surnageant contenant le biosurfactant est acidifié à pH 2 à l'aide d'une solution de HCl (6 mol/L), une conservation à froid pendant une nuit à 4 °C. Ensuite, une centrifugation est réalisée à vitesse maximale de 4500 tr/min pendant 30 min. Le précipité ainsi formé est redissous dans un petit volume d'eau distillée,
- La solution formée en biosurfactant est ensuite soumise à l'extraction liquide-liquide par un solvant (l'acétate d'éthyle) dans une ampoule à décanter (la phase aqueuse de la première extraction est reprise dans une deuxième extraction par le solvant). Le solvant d'extraction est éliminé par la suite par évaporation à 40 °C dans un système sous vide (un Rotavap).

II.11. Application de biosurfactant dans le secteur alimentaire

II.11.1. Préparation des sauces émulsionnées : la mayonnaise

A cause des propriétés intéressantes de notre biosurfactant issu de la souche SH12 (TS = 31.4 mN/m ; DDP = 7 cm ; E24 = 45 %), nous avons tenté d'introduire ce biosurfactant comme additif dans la formulation de la mayonnaise par la substitution du jaune d'œuf (ou à moitié puis complètement).

La mayonnaise représente une émulsion de type directe (huile dans l'eau), complexe, finement dispersée, stable et grasse, dans laquelle la phase dispersée est distribuée sous forme de gouttelettes fines au sein du milieu de dispersion.

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

Pour réaliser ce travail, Nous avons respecté le protocole suivi par **Mokdad (2015) [88]** en collaboration avec la Société industrielle de Dénaturation Nord-Africaine (SIDNA).

a. Préparation de la phase aqueuse

Après le pesage de tous les ingrédients nécessaires à cet essai. La dispersion est assurée par agitation pendant un certain temps, pour que les ingrédients s'hydratent et se dispersent finement.

b. Préparation de la phase huileuse

Un mélange d'une quantité d'huile avec l'agent émulsifiant dans le but d'assurer une bonne hydratation.

c. Emulsification

Pour assurer une bonne émulsification de la préparation, faire verser lentement la phase huileuse dans la phase aqueuse, sous une forte agitation. Le mélange devient opaque et homogène, puis le vinaigre est additionné à la fin de l'émulsification. Les échantillons de la mayonnaise 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 II.5: Quantités des ingrédients utilisés pour la sauce mayonnaise

Les ingrédients	Quantité
Huile de soja	90 ml
Eau	90 ml
Moutarde	11.4 g
Sel	1 g
Sucre	1.4 g
Vinaigre blanc (SIDNA)	5.7 ml
Biosurfactant	12.5 ml



Chapitre III

Résultats et discussion

L'objectif principal de notre travail est la sélection d'une souche performante productrice de biosurfactant à caractère émulsifiant, la production et l'application de ce biosurfactant/bioémulsifiant dans le domaine alimentaire pour la préparation de la mayonnaise. Selon la recherche bibliographique, il y a moins de travaux réalisés pour la production de biosurfactants à partir des eaux marines en particulier les sédiments contaminés. Ceci montre l'importance d'entamer cet axe de recherche.

Les souches bactériennes aérobies mésophiles productrices de biosurfactants utilisées dans notre travail ont été isolées à 30 °C à partir de deux sites : sédiment contaminé par les hydrocarbures (port de Port de pêche de Khemisti, Tipaza) et les algues marine (zone du complexe Corne d'or Tipaza).

III.1. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants

Au total, sept souches bactériennes (BS1 , BS2 ,BS3 ,BS4 ,BS5 , SH12,SH7) ont été choisies pour sélectionner la souche performante productrice de biosurfactant en utilisant l'huile d'olive (1%) comme source de carbone et d'énergie, elle est considérée parmi les meilleurs substrats d'induction de biosurfactants [89, 90]. Nous avons réalisé une étude cinétique de la production de biosurfactant afin de sélectionner la souche performante pour une application alimentaire (préparation de la mayonnaise).

Sapute et al (2010) [84] recommandent l'utilisation de plus d'une méthode de dépistage pour la détection des microorganismes producteurs de biosurfactants. En effet, la détection de notre biosurfactant dans le milieu de culture est basée sur quatre tests :

- La tension superficielle (TS, mN/m),
- Le déplacement de pétrole (DDP, cm),
- L'activité émulsifiante (E24, %) :
- La densité optique (DO à 600 nm).

La tension de surface est considérée comme le paramètre principal pour la détection de la production de biosurfactant. Selon **Batista et al (2006)[91]**, un microorganisme est considéré comme producteur de biosurfactant, lorsque le surnageant contenant le biosurfactant a la capacité de diminuer la tension superficielle à des valeurs inférieures à 40 mN/m. Un critère similaire, pour la détection des microorganismes producteurs de biosurfactants[92], qui considère qu'un microorganisme est bon producteur de composés tensioactifs si son

surnaçant métabolique est capable de réduire la tension superficielle de l'eau de 72 à 35 mN/m ou en dessous de cette valeur.

Le test de déplacement d'huile (pétrole) ne nécessite aucun équipement spécialisé. La méthode est rapide et simple qui peut être réalisée avec de petits volumes d'échantillon [93]. Généralement, le DDP est utilisé pour le criblage des souches productrices de biosurfactants[39].

Selon **Youssef et al (2004)[94]**, un microorganisme est considéré comme un bon producteur de biosurfactant si son surnageant donne un DDP égal ou supérieur à 3cm (correspond à TS = 35 mN/m). Selon ces auteurs, il y a une corrélation entre le DDP et la TS. Cependant, leurs résultats obtenus ont montré que des tests positifs ou négatifs de l'activité hémolytique n'indiquent pas la production de biosurfactants.

✓ Rapport C/N

Le rapport C/N (masse substrat/masse substrat azoté : masse huile d'olive/masse NH_4NO_3) utilisé dans nos expériences a été fixé à 17,5.

Le rapport carbone/azote (C/N) est utilisé pour décrire la relation entre la proportion de carbone et d'azote nécessaire dans le milieu de production de biosurfactant par des microorganismes. Le rapport C/N requis par la culture microbienne dépend des différents types de microorganismes utilisés, du type carbone et azote, des conditions de culture et du produit recherché[95].

Des rapports C/N élevés (faible quantité d'azote) limitent la croissance bactérienne, favorisant le métabolisme cellulaire vers la production de métabolites. Par exemple, lors de la supplémentation en glycérol et NaNO_3 , le rapport (C/N) a été fixé à 55 en présence de *P.aeruginosa*, cela dans des conditions limitantes d'azote. Cependant, dans la plupart des travaux antérieurs, le rapport C/N (condition non limitante d'azote) approprié commun pour le producteur typique de biosurfactants, est compris entre 6 et 13 [96;97]. **Hamza et al[98]** ont suggéré qu'il existe un effet inhibiteur possible sur *P. aeruginosa* UKMP14T lorsqu'un rapport C/N supérieur à 20 a été utilisé.

III.2. Effet des éléments de traces métalliques sur la production de production

Les minéraux peuvent être classés en deux groupes : les minéraux macronutriments et les minéraux micronutriments (oligo-éléments). Le potassium (K), le calcium (Ca), le magnésium

(Mg) et le fer (Fe) servent de minéraux macronutriments dans la formulation du milieu qui sont importants pour équilibrer la communication de la paroi cellulaire et aider au mécanisme de synthèse des protéines [99]. Cependant, ces ions métalliques peuvent devenir une menace intracellulaire lorsqu'ils sont présents en excès. Dans le processus de croissance, un ion métallique agit comme régulateur pour la production de matériaux physiologiquement actifs comme un biosurfactant.

Dans notre cas, nous avons testé deux milieux de culture pour la production de biosurfactants :

- Milieu MM + ions de Fer
- Milieu MM + Oligo-éléments

III.2.1. Milieu MM + ions de Fer

Le fer est un cofacteur très important dans le métabolisme de divers microorganismes. La plupart des formulations utiliseront le fer sous forme d'ions Fe^{2+} ou Fe^{3+} selon le mécanisme d'absorption du fer par le microbe lui-même. Fe^{2+} est généralement soluble dans l'eau et peut être facilement utilisé par le micro-organisme par rapport à Fe^{3+} . La plupart des formulations dans le milieu MM utilisant Fe^{2+} fourni par $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ [96, 100] tandis que le milieu Bushnell-Haas utilisait $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ pour contribuer Fe^{3+} dans le milieu de production [101].

Dans notre cas, les ions de fer ont été utilisés sous forme de $FeCl_3$ (60% 60g /100ml eau ; 20 microlitres). D'après les résultats obtenus après 3 jours d'incubation, on compte six souches productrices de biosurfactants a cause de la réduction de la tension de surface au-dessous de 40 mN/m. Cependant, excepté la souche BS2 et SH12 où nous avons enregistré des valeurs DDP supérieures à 6 cm, le DDP des autres est inférieur a 2 cm (Tableau III.6 et Figure III.13). L'observation visuel de l'émulsification contre quatre composés hydrophobes (huile de soja, huile d'olive, gasoil et le pétrole), annexe 2, montre que les surnageants contenant les biosurfactants réagissent différemment avec ces composés. Cela revient au type (structure) de biosurfactant qui dépend de son microorganisme (Tableau III.7).

Tableau III.6: Effet des ions de Fer sur la production de biosurfactant (mesure TS et DDP)

Souche	BS3	BS4	BS5	BS1	9R	8R	17R	BS2	SH12
TS (mN/m)	35.5	35.9	38.7	36.5	40.6	44.6	40	36.55	33.36
DDP (cm)	1.4	1.35	0.8	0.4	1	0.3	1.1	6.55	6

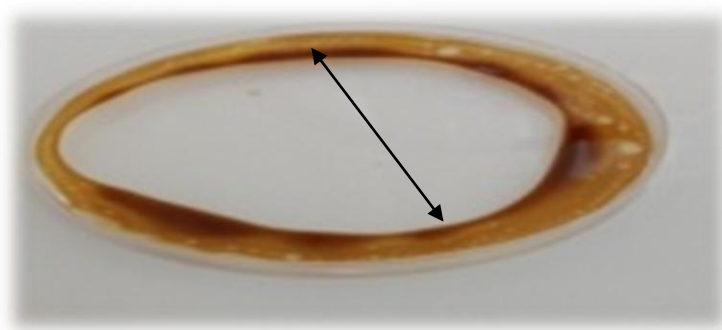


Figure III.13 : Halo claire en présence de biosurfactant (souche BS2)

Tableau III. 7: Emulsification contre des substrats hydrophobes

Souche	BS2	BS3	Kr	Er	Fr	Or	BS5	BS4
H. soja	-	-	-	+	-	+	-	-
H. olive	-	+++	+	-	-	+	+++	+++
Gasoil	-	++	++	+++	+++	+	+	+
Pétrole	+	-	++	+++	-	+	-	++

- : Absence d'émulsification ; + : Faible présences d'émulsification

++ : présence d'émulsification ; +++ : Très bonne émulsification

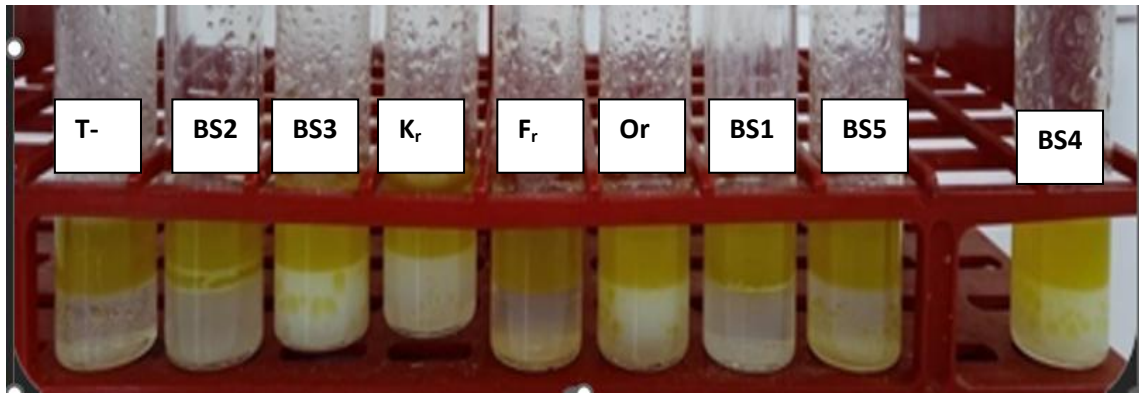


Figure III.14: Emulsification contre huile d'olive par surnagent de différentes souches

a. Test de la tension de surface (TS)

D'après le tableau III.8, nous constatons que six souches (BS2, BS4, BS3, BS5, SH7 et SH12) ont montré une capacité de production de biosurfactants. Cela traduit par la réduction de la tension de surface au-dessous de 40 mN/m. Cependant, ce tableau montre que le temps d'incubation pour la production maximale de biosurfactants dépend du microorganisme. Donc, après un jour d'incubation, on trouve les souches : BS4 (37,7 mN/m) ; SH7 (37,3 mN/m) ; BS5 (35,5 mN/m) ; SH12 (31,4 mN/m). La production maximale de la souche BS2 était après 2 jours d'incubation, concernant la souche BS3, sa production maximale n'est obtenue qu'après 7 jours. Ce qui montre l'effet du temps d'incubation sur la production de biosurfactant.

Treize isolats, isolés à partir d'un sédiment contaminé par les hydrocarbures, ont été testés par **Zenati (2018) [39]** pour la production de biosurfactants. Les résultats obtenus montrent que six (06) souches sont considérées comme productrices de biosurfactants (TS inférieur à 40 mN/m) après trois jours d'incubation. Cependant, La meilleure souche dans cette collection est nommée SdK644, qui a réduit la TS de 45,5 à 29,2 mN/m en utilisant l'huile d'olive (1% v/v) comme substrat. Egalement, **Eddouaouda (2012) [38]** a fait le criblage de neuf (09) souches bactériennes mésophiles dans un milieu LB avec 1% (v/v) d'huile d'olive comme source de carbone. La souche *Staphylococcus sp.* 1E a montré une activité de surface très marquée (TS = 25,8 mN/m) après 48h d'incubation à 37 °C.

Les travaux réalisés par **Mokdad et al (2016) [102]** ont révélé qu'une diminution importante de la tension de surface a été obtenue après un jour d'incubation (31 mN/m) avec une souche de *Bacillus* et en présence de 1% d'huile d'olive.

Tableau III.8: Cinétique de production de biosurfactants (Mesure de TS en fonction du temps d'incubation)

Souche	BS2	BS3	BS4	BS5	BS1	SH7	SH12
1 j	34.5	35.5	37.7	35.5	40	37.3	31.4
2 j	37.9	37.4	38.7	39.6	44.6	39.1	36.7
3 j	40.8	38.5	40.5	39.8	40	41	37.9
7 j	42	33.5	40	40.4	43.4	38.5	45.2

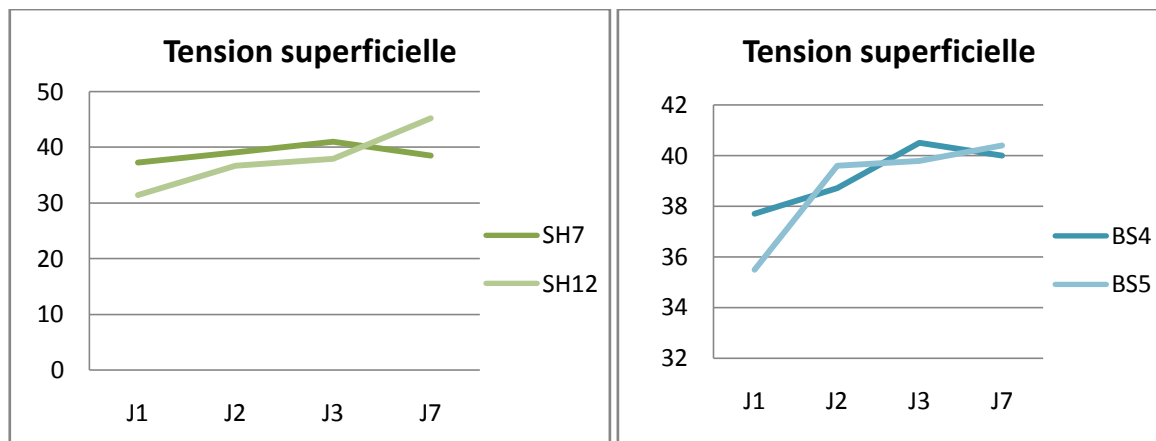


Figure III.15: Evaluation de tension de surface en fonction du temps d'incubation

b. Test de déplacement de pétrole (DDP)

Dans ce travail, nous avons mesuré le DDP des surnageants de production de biosurfactants de sept souches bactériennes pendant 7 jours. Tableau III.9 représente la variation de DDP en fonction du temps d'incubation. En s'appuyant sur le critère de **Youssef et al, (2004) [94]** correspondant à la production de biosurfactants pour un DDP supérieur à 3 cm (TS inférieure à 35 mN/m), les résultats obtenus ont montré que trois souches (BS2 , BS4 et BS1) ont commencé la production de biosurfactants qu'après le troisième jour. Toutefois, la production de biosurfactant a débuté dès le premier jour pour les souches BS3 et SH12 et le deuxième jour la souche SH7 (Tableau III.9).

A titre comparatif entre les deux tableaux III.8 et III.9, les souches BS2 et BS4 ont commencé la production de biosurfactant après le premier jour et ceci selon les valeurs de TS, 34.5 et 37.7 mN/m respectivement. Cependant, si on prend le DDP comme critère, ces deux souches ont commencé la production qu'après le troisième jour. Ces résultats montrent l'importance d'utiliser plus d'une méthode de dépistage pour la détection de la production de

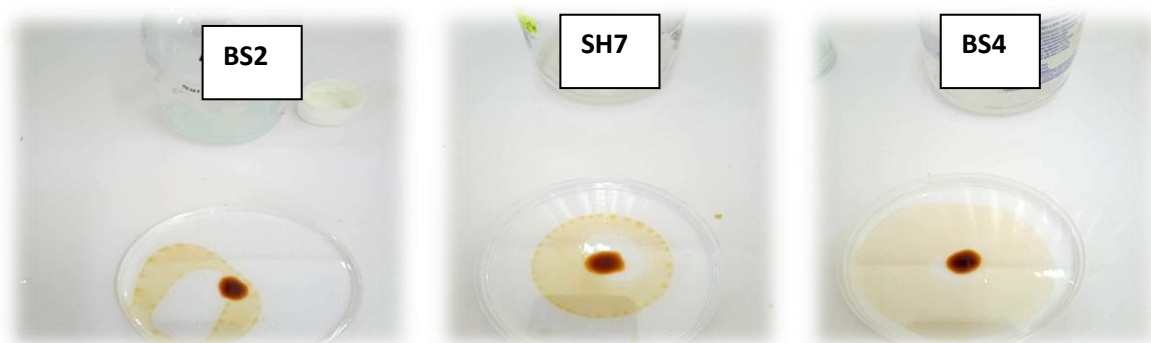
biosurfactants. Cela a été soutenu par **Sapute et al. (2010) [84]** qui recommandent l'utilisation de plus d'une méthode de dépistage pour la détection de biosurfactants dans le milieu de culture.

Une étude réalisée par **Panjiar et al., (2015) [103]** a indiqué que le DDP a été effectué sur 88 souches. 25 souches ont montré que leurs surnageants ont donné un DDP supérieur à 5 cm. Une étude récente de **Haleem et al., (2018) [104]** a rapporté que le surnageant, contenant le biosurfactant de la souche *Stenotrophomonas maltophilia*, a enregistré un DDP supérieur à 0,6 mm avec une tension superficielle (TS) égale à 33,9 mN/m.

Étant donné que la concentration de biosurfactant qui dépasse la concentration micellaire critique (CMC) n'entraînera pas des diminutions supplémentaires de la tension superficielle, la technique de déplacement d'huile (DDP) a une plage dynamique plus large que la tension superficielle. Il est également facile à réaliser et à standardiser et prend moins de temps que les mesures de tension superficielle, ce qui le rend applicable aux grandes études de dépistage[96].

Tableau III.9: Variation de DDP (cm) en fonction du temps d'incubation

Souche	BS2	BS3	BS4	BS5	BS1	SH7	SH12
1 j	1.4	3.1	1.9	2.9	1.0	1.1	5.0
2 j	0.9	2.0	1.3	0.8	0.2	3.1	5.5
3 j	2.8	2	1.3	1.7	1.6	2	7.0
7 j	-	2,65	2.0	1.0	1.5	1.75	-



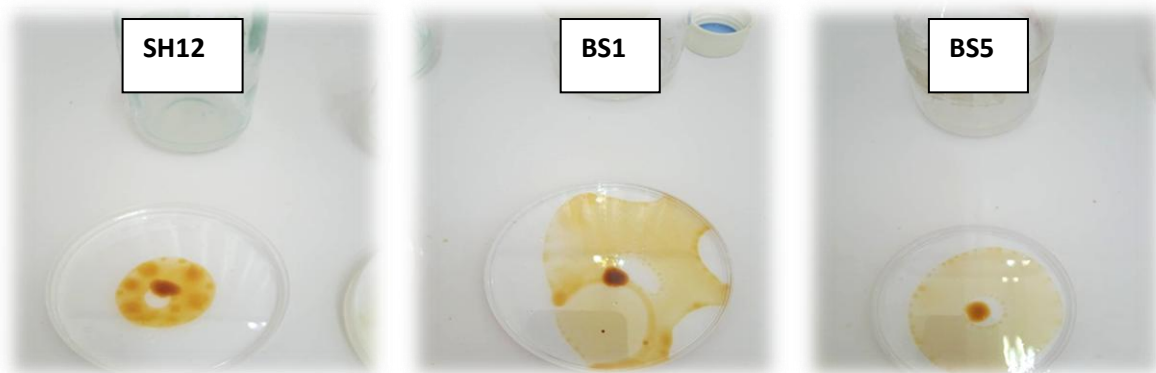


Figure III.16: Détermination du DDP après 3 jours d'incubation

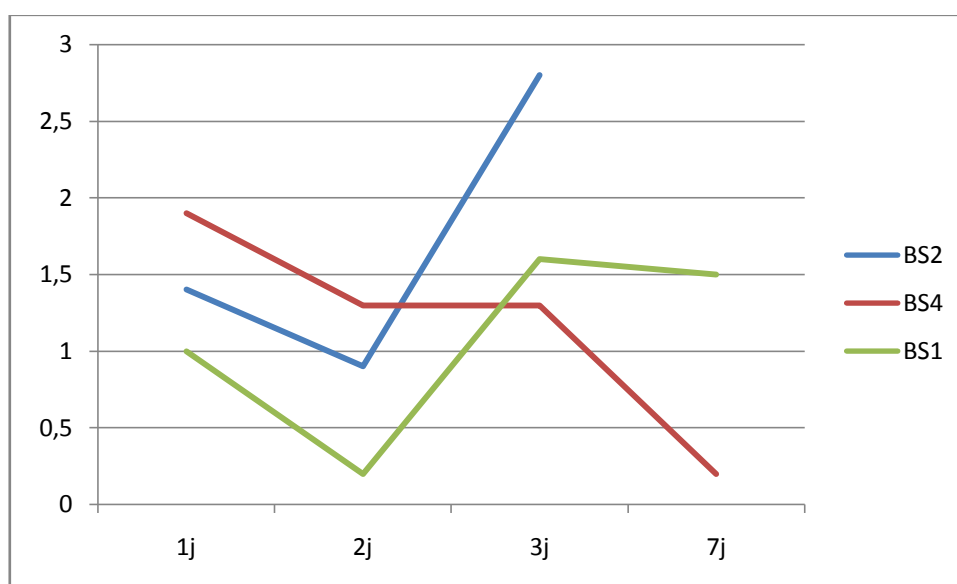


Figure III.17 : Déplacement de pétrole pendant 7 jours

b. Activité émulsifiante (E24)

L'activité d'émulsification des sept souches bactériennes marines a été testée par le calcul de l'indice d'émulsification du surnageant (E24) pendant sept jours d'incubation. Les résultats obtenus montrent que certaines souches possèdent la capacité de produire des biosurfactants à caractère émulsifiant. Parmi les 7 souches choisies pour cette étude, nous pouvons compter 5 souches ayant un pouvoir d'émulsification (Figure III.18). Par comparaison avec la Figure III.14, il semble que le milieu culture MM supplémenté des ions de fer favorise la production de biosurfactant à caractère émulsifiant.

Les travaux de **Reddy et al., (2018) [105]** ont montré que le biosurfactant a réduit la tension superficielle à 37,9 mN/m, ce qui représente une réduction de 57 % de la tension superficielle par rapport au contrôle (eau distillée) et avec un indice d'émulsification (E24) de 47,4 %.

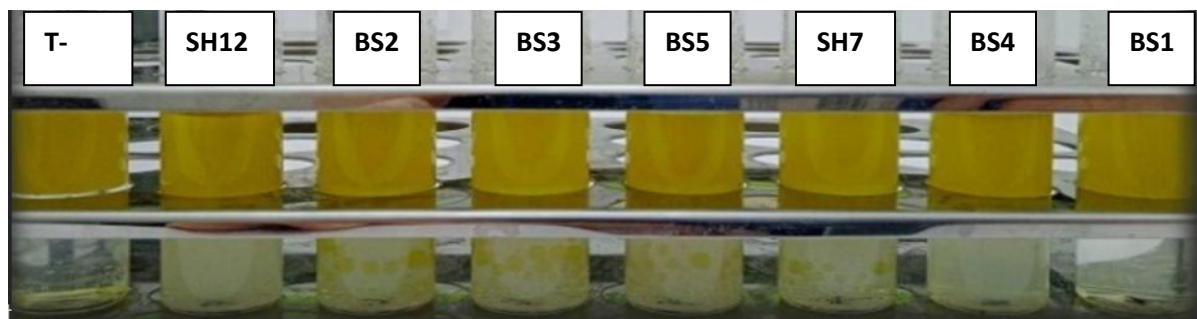


Figure III.18: Emulsification contre huile d'olive après 2 jours d'incubation

Egalement, l'activité émulsifiante a été étudiée par **Adetunji et Olaniran (2019) [106]** sur deux souches productrices de biosurfactants, les résultats obtenus ont décelé des valeurs E24 dépassant les 68% contre l'huile de tournesol. Cependant les valeurs de la tension de surfaces étaient supérieures à 46 mN/m en présence 1% d'huile d'olive comme source de carbone et d'énergie. Le milieu a été incubé à 37 °C pendant 7 jours. Par conséquent, les biosurfactants issus de ces deux souches ont classés comme bioémulsifiants.

c. Croissance bactérienne : DO à 600nm

Les travaux antérieurs indiquent que la production maximale de production s'est produite dans la phase stationnaire de croissance. Selon les résultats rassemblés dans le tableau ci-dessous, nous tirons les observations suivantes. Les valeurs de DO (600 nm) enregistrées dépendent de type du microorganisme, la densité optique la plus élevée était 0,74 pour la souche BS2 ceci après 2 jours d'incubation, suivie par la souche BS1 (DO = 0,556 après 2 j d'incubation), la souche BS3 (DO = 0,43 après 3 j d'incubation) et la souche BS4 (DO = 0,4 après 3 d'incubation).

Tableau III.10: Cinétique de croissance bactérienne(DO a 600 nm)

Souche	0 j	1j	2j	3j	7j
BS1	0.017	0.556	0.132	0.088	0.175
BS2	0.045	0.168	0.258	0.740	-
BS3	0.048	0.294	0.200	0.432	0.192
BS4	0.015	0.310	0.377	0.400	0.128
BS5	0.03	0.175	0.312	0.395	0.183
SH7	0.019	0.581	0.739	0.13	0.361
SH12	0.036	0.515	0.477	0.193	0.192

pour la souche BS3, la croissance cellulaire maximale (DO 600 nm = 0.432) à 72h correspondant à une tension de surface minimale égale à 35.5 mN/m. Même chose pour la souche BS3, où les deux paramètres (DO = 0.432 et TS = 35.5 mN/m) sont corrélés après 72h d'incubation.

Ceci est en accord avec les travaux réalisés par **Adetunji et Olaniran (2019) [106]**, la production maximale de biosurfactant issu de la souche *Acinetobacter sp. Ab9-ES*, l'E124 a atteint la valeur la plus élevée (E24 = 83,8 %) à 168 h pendant la phase de croissance stationnaire. Egalement, les résultats obtenus par **Pornsunthorntawee et al. (2008) [107]**, montrent que la production maximale de biosurfactant par *Bacillus subtilis PT2* a été observée pendant la phase stationnaire (DO est mximale). Cependant, Une activité émulsifiante maximale (60 %) d'*Aeribacillus pallidus* YM-1 a été rapportée pendant la phase exponentielle [108]. Cela est confirmé par nos résultats de certaines souches où la production maximale a été observée pendant la phase exponentielle (tableaux III.8 et III.10). Par exemple, pour souche BS3, la croissance cellulaire maximale (DO 600 nm = 0.75) à 72h mais la production de biosurfactant a commencé après le premier jour et a duré trois jours. Durant cette période, la tension superficielle reste presque constante (33.5 et 34.5 mN/m). Donc, on peut conclusion que la production de biosurfactant par cette souche s'est effectuée durant les deux phases de croissance bactérienne (exponentielle et stationnaire).

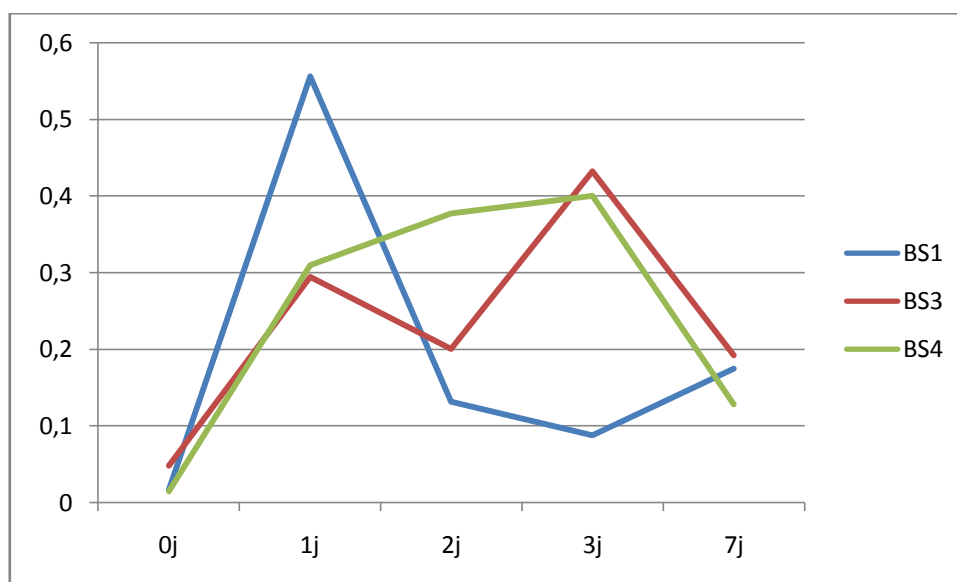


Figure III.19 : Absorbance en fonction de temps

III.2.2. Milieu MM + éléments de traces métalliques (ETM)

L'ajout de certains minéraux ou oligo-éléments micronutriments pourrait avoir un effet positif sur la production de biosurfactants. Les oligo-éléments sont des éléments chimiques nécessaires aux microorganismes en quantités faibles. Les exigences spécifiques des oligoéléments dépendent du microorganisme lui-même, mais les oligoéléments les plus utilisés par les producteurs de biosurfactants sont le zinc (Zn), le cuivre (Cu), le bore (B), le molybdène (Mo) et le cobalt (Co).

Dans notre cas, le milieu MM est supplémenté de 1% ETM. Les résultats obtenus ont permis de déceler l'effet positif des oligoéléments sur la production de biosurfactants. Les résultats sont illustrés dans les tableaux III.6 à III.9

Makkar et Cameotra (2002) [51] ont ajouté différentes concentrations d'oligo-éléments (0, 1, 2, 4, 6, 8 et 16 %) dans le milieu de production du biosurfactant pour *B. subtilis* MTCC 2423. Les résultats ont démontré que la production de biosurfactant était maximale pour 1% ETM (1ml/L). Cependant, il y a une augmentation de la biomasse lorsque plus de 4 % (4 ml/L) d'éléments de traces étaient ajoutés au milieu de production. Cela a été soutenu par **Kiran et al. (2009) [109]** qui ont montré que d'autres incréments de FeSO_4 et MgCl_2 utilisés à partir de la concentration d'origine (0,1 mM) inhibent considérablement la production de biosurfactants.

III.3. Essai d'application de biosurfactant dans le domaine alimentaire

Le biosurfactant issu de la souche SH12 a été intégré dans la préparation de la sauce mayonnaise. Pour cela, nous avons utilisé le surnageant et le biosurfactant brut contenant du biosurfactant comme la phase aqueuse. Seulement les analyses organoleptiques ont été prises en considération. Les résultats obtenus sont illustrés dans Tableau III.11. Les figures représente la mayonnaise préparée par nos biosurfactant et surnagent .

Tableau III.11: Comparaison organoleptique de différente base de mayonnaise

Propriétés organoleptiques	Mayonnaise SIDA	Mayonnaise préparée par le surnageant contenant le biosurfactant	Mayonnaise préparée par le Biosurfactant brut
Aspect (visuel)	Liquide visqueux émulsionné et homogène	Liquide visqueux et homogène	Liquide homogène et
Saveur	Grasse onctueuse et légèrement acide	Légèrement acide	acide
Odeur	Franche et caractéristique de la mayonnaise	Odeur de la mayonnaise commerciale	franche
Couleur	Jaune clair	Jaune claire	jaune



Figure III.20 : mayonnaise préparé par surnagent



Figure III.21 : mayonnaise préparé par biosurfactant

La mayonnaise est un produit crémeux sous la forme d'une émulsion huile-dans-eau stable à base d'huile(s) végétale(s), d'eau et d'œufs, avec l'ajout éventuel d'autres ingrédients qui ne modifient pas la constitution de base du produit. La stabilité de l'émulsion dépend de la quantité de l'émulsifiant ajouté, plus la quantité augmente plus la stabilité est performée jusqu'à une concentration critique, dans ce cas l'émulsifiant donne un effet inverse, donc la stabilité est diminuée. Les résultats obtenus ne présentent qu'une première étape (évaluation sensorielle) dans la préparation d'une mayonnaise. D'autres essais seront nécessaires comme la stabilité physique, chimique et l'étude rhéologique pour pouvoir confirmer les performances de l'émulsion.

Conclusion générale

Les microorganismes, en particulier les bactéries, restent un vrai réservoir pour la production des biomolécules utilisables dans les domaines de biotechnologies environnementale et industrielle. Généralement, les sites contaminés par les substances hydrophobes sont très recherchés pour isoler des souches microbiennes ayant des potentialités élevées de production de biosurfactants. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés dans une première partie du travail au criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants.

Sept souches bactériennes marines ont été criblées pour leurs productions de biosurfactants, le criblage nous a permis de choisir une souche performante productrice de biosurfactant afin d'appliquer ce dernier dans le domaine alimentaire. La production de biosurfactant a été réalisée dans un milieu, optimisé préalablement, à base de sels minéraux supplémenté de 1% (v/v) d'huile d'olive comme seule source de carbone et d'énergie, NH_4NO_3 (1 g/l), pH 8, salinité 30 g/l et 72h d'incubation sous agitation 200 tr/min. L'effet des ions de fer sur la production de biosurfactants et croissance bactérienne a été envisagé. Trois paramètres ont été suivis pour étudier la cinétique du biosurfactants produits par les souches bactériennes marines choisies : la tension de surface, le déplacement de pétrole et l'activité émulsifiante. La croissance bactérienne a également suivie afin de la phase de production de biosurfactant.

Les résultats obtenus montrent que la souche SH12 possède des potentialités intéressantes de la production de biosurfactant. Cela traduit par la réduction de la tension de surface à 31,4 mN/m, un diamètre de déplacement de pétrole de 7 cm et une activité émulsifiante exprimée par l'indice d'émulsification plus de 45 %.

Egalement, l'utilisation une seule technique ne suffit pas le dépistage de la production de biosurfactants. L'ajout des éléments de traces métalliques est nécessaire pour la croissance et la production des métabolites.

Finalement, une application de biosurfactant en agroalimentaire a été réalisée par la préparation de la mayonnaise en utilisant le surnageant contenant le biosurfactant issu de la souche SH12. Deux formules de préparation ont été effectuées : formule 1 (en présence de

biosurfactant brut), formule 2 (en présence de surnageant contenant le biosurfactant). Les résultats organoleptiques montrent qu'il est possible d'utiliser de ce biosurfactant issu de la souche SH12 dans la formulation de la mayonnaise

A la lumière de ces résultats, il est souhaitable de compléter cette étude par d'autres paramètres, à savoir :

- Purification de biosurfactant issu de la souche SH12
- Caractérisation physico-chimique, biochimique et structurale
- Etude physico-chimique et rhéologique des émulsions formées.



Références bibliographiques

Références bibliographiques:

- [1] Markets and Markets, 2016. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactantsmarket-493.html>. Accessed March 8, 2018.
- [2] Santos DKF, Rufino RD, Luna JM, Santos VA, Sarubbo LA (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *Int J Mol Sci* 17(3):401
- [3] Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M. 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB express*, 1(1), 5.
- [4] Farias C B B, Almeida F C G , Silva I A , Souza T C, Meira H M, Banat I M, Sarubbo LA (2021) Production of green surfactants: Market prospects *Electronic Journal of Biotechnology* 51. 28–39.
- [5] Banat IM, Satpute SK, Cameotra SS, Patil R, Nyayanit NV (2014) Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Front Microbiol* 5:697
- [6] Nitschke, M., and Silva, S. S. E. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Food Sci. Nut.* 58, 631–638. doi: 10.1080/10408398.2016.1208635
- [7] Khanna, S., and Pattnaik, P. (2019). Production and functional characterization of food compatible biosurfactants. *Appl. Food Sci. J.* 3, 1–4.
- [8] Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., and Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: physicochemical properties and applications. *Adv. Colloid Int. Sci.* 275, 1–22. doi: 10.1016/j.cis.2019.102061
- [9] Laurine CAULLET, Alexandra Dos Santos, Geoffrey Knipper, Margaux RUSALEN et Marie SEIGNEUR Projet Professionnel 2017-2018, les émulsion alimentaire et cosmétiques,
- [10] FRIBERG Stig E., LARSSON Kare and SJÖBLOM, *Food Emulsions Fourth Edition*
- [11] Pires T. C. S. P., Dias M. I., Barros L., Ferreira I. C. F. R. (2017). Nutritional and chemical characterization of edible petals and corresponding infusions: valorization as new food ingredients. *Food Chem.* 220 337–343. 10.1016/j.foodchem.2016.10.026
- [12] DUPASQUIER M.-L., NAZARI A., FONTAINE-VIVE F., FERNANDEZ X., GOLEBIOWSKI J., CDIEC, Université de Nice Sophia Antipolis, Formulation cosmétique, Les émulsions
- [13] Silvi S, Barghini P, Aquilanti A, Juarez-Jimenez B, Fenice M (2013) Physiologic and metabolic characterization of a new marine isolate (BM 39) of *Pantoea* sp. producing high levels of exopolysaccharides. *Microb Cell Fact* 12:10.

- [14] Mukherjee, A.K. and K. Das, *Microbial surfactants and their potential applications: an overview*, in *Biosurfactants2010*, Springer.
- [15] West, C.C. and J.H. Harwell, *Surfactants and subsurface remediation*. Environmental Science & Technology, 1992.
- [16] Mehta , S., et al., *Biomimetic amphiphiles: Properties and potential use*, in *Biosurfactants2010*, Springer.
- [17] Marchant, R. and I.M. Banat, *Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants?* Biotechnology letters, 2012.
- [18] Rebello, S., et al., *Surfactants: chemistry, toxicity and remediation*, in *Pollutant Diseases, Remediation and Recycling2013*, Springer.
- [19] Mulligan, C.N., *Environmental applications for biosurfactants*. Environmental Pollution, 2005.
- [20] Banat, I.M., et al., *Microbial biosurfactants production, applications and future potential*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. 87(2):
- [21] Derguine-Mecheri, L., et al., *Screening and biosurfactant/bioemulsifier production from a high-salt-tolerant halophilic Cryptococcus strain YLF isolated from crude oil*. Journal of Petroleum Science and Engineering, 2018.
- [22] Mnif, S., *Microbiologie de certains gisements pétroliers tunisiens : Biodégradation des hydrocarbures, production de biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne moyennant la technique de la SSCP*, in *Faculté des sciences de Sfax2012*, Université de Sfax, Tunisie.
- [23] Kedidi A. 2014. Effets de salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par des souches Bactériennes telluriques en présence du gasoil. Mémoire de Master en Microbiologie appliquée. Université Kasdi Merbah, Ouargla. 38p.
- [24] Dubeau, D., Deziel, E., Woods, D. E., Lepine, F. 2009. Burkholderia thailandensis harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. BMC Microbiol. 9 :263. 10.1186/1471-2180-9-263.
- [25] Ron E.Z, Rosenberg E, (2002). Biosurfactants and oil remediation. Current Opinion in Biotechnology, 13 : 249-252.
- [26] Kappeli, O. et Finnerty, W. R., “Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane grown *Acinetobacter*”. *J. Bacteriol.*, V. 140, n° 2, (November 1979), 707–712
- [27]Bodour, A.A., Drees, K.P., Maier, R.M. 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. Applied and environmental microbiology, 69(6), 3280-3287.

- [28] Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), 609-618.
- [29] Vijayakumar, S., Saravanan, V. 2015. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Res. J. Microbiol*, 10 (5), 181-192.
- [30] Cirigliano, M.C. et Carman, G.M., “Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*”. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 50, n° 4, (October 1985), 846–850
- [31] Rosenberg E, Ron EZ (1999) High- and low-molecular mass microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 52(2):154–162
- [32] Zosim, Z., Guntick, D. L. et Rosenberg, E., “Properties of hydrocarbon in water emulsion”. *Biotechnol. Bioeng.*, V. 24, n° 1, (October 1982), 281– 292
- [33] Hu, Y. et Ju, L.K., “Purification of lactonic sophorolipids by crystallization”. *J. Biotechnol.*, V. 87, n° 3, (May 2001), 263–272.
- [34] Mulligan C.N. “Recent advances in the environmental applications of biosurfactants”. *Current Opinion Colloid Interface Sci.* (2009). 14: 372–378
- [35] Santos A.P.P., Silva M.D.S., Costa E.V.L., Rufino R.D., Santos V.A., Ramos C.S., Sarubbo L.A., Porto A.F.L. “Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon”(2018)
- [36] Hommel, R.K., “Formation and function of biosurfactant for degradation of water insoluble substrates”. In: Ratledge, C. (Ed.). *Biochem. Microbial degradat.* Dordrecht, Boston. Kluwer Acad. Publis., (1994), 63-
- [37] Padmapriya B., Suganthi S., Anishya R.S. “Screening, optimization and production of biosurfactants by *Candida* species isolated from oil pollutedsoils”. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Sciences.* (2013). 13: 227-233
- [38] Eddouaouda K., Mnif S., Badis A., Ben Younes S., Cherif S., Ferhat S., Mhiri N., Chamkha M. and Sayadi S. “Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on bioremediation of hydrocarbons contaminated sites”. *Journal of Basic Microbiology.* (2012), V. 52 (4), pp. 408 – 418.
- [39] Zenati, B., Chebbi, A., Badis, A., Eddouaouda, K., Boutoumi, H., El Hattab, M., Hentati, D., Chelbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M., Franzetti, A. « A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement ». *Ecotoxicol Environ Saf* (2018). 154 100-107

[40] Nitschke M, Costa SG “Biosurfactants in food industry”. *Trends. Food. Sci. Tech.* (2007). 18: 252-259.

[41] Jorfi, S.; Rezaee, A.; Mobeh-Ali, G. A.; Jaafarzadeh, N. A., Application of Biosurfactants Produced by *Pseudomonas Aeruginosa* SP4 for Bioremediation of Soils Contaminated by Pyrene. *Soil & Sediment Contamination* 2013, 22 (8), 890-911 10.1080/15320383.2013.770439

[42] Jain, R. M.; Mody, K.; Joshi, N.; Mishra, A.; Jha, B., Effect of Unconventional Carbon Sources on Biosurfactant Production and its Application in Bioremediation. *International Journal of Biological Macromolecules* 2013, 62, 52-58 10.1016/j.ijbiomac.2013.08.030

[43] De, S.; Malik, S.; Ghosh, A.; Saha, R.; Saha, B., A Review on Natural Surfactants. *RSC Advances* 2015, 5 (81), 65757-65767 10.1039/c5ra11101c

[44] Datta, P.; Tiwari, P.; Pandey, L. M., Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing and Oil Degrading *Bacillus Subtilis* MG495086 from Formation Water of Assam Oil Reservoir and its Suitability for Enhanced Oil Recovery. *Bioresource Technology* 2018, 270, 439-448 10.1016/j.biortech.2018.09.047

[45] Sabati, H.; Motamedi, H., Ecofriendly Demulsification of Water in Oil Emulsions by an Efficient Biodemulsifier Producing Bacterium Isolated from Oil Contaminated Environment. *Biotechnology Letters* 2018, 40 (7), 1037-1048 10.1007/s10529-018-2565-9

[46] Sudhanshu, S., Arumugam, S., Tangavel, B. 2015. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45, 1522-1554.

[47] Pruthi, V., Cameotra, S.S. 1995. Rapid Method for Monitoring Maximum Biosurfactant Obtained by Acetone Precipitation. *Biotechnol Techniq*, Vol. 9, p. 271-276.

[48] Krepsky, N., Da Silva, F. S., Fontana, L.F., Crapez, M.A.C. 2007. Alternative Methodology for Isolation of Biosurfactant-Producing Bacteria. *Braz. J. Biol.*, Vol. 67, N°. 1, p. 117-124.

[49] Mulligan C.N., Sharma S.K et Mudhoo A. (2014). Biosurfactants research trends and applications. International standard book number: 13:978-1-4665-1724-4-7.

[50]Velikonja J. and Kosaric N., "Biosurfactant in food application", In N. Kosaric (Ed), New York: Marcel Dekkar. Biosurfactant: Production, properties and applications, (1993). 419 - 449.

[51]Cameotra, S.S., Makkar, R.S. 2002. An update on the use of unconventional substratesfor biosurfactant production and their new applications. Appl. Microbiol. Biotechnol,58,428-434

[52] Santos, D.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Scrubbed, L.A. 2013. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. Journal of Petroleum Science and Engineering, 105, 43–50. Santos, D.F., Rufino, R.D., Luna, J.M., Santos, V.A., Scrubbed, L.A. 2013. Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor. Journal of Petroleum Science and Engineering, 105, 43–50.

[53]Mulligan, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environmental pollution, 133(2), 183-198.

[54] Kosaric, N., Sukan, F.V. 2000. Biosurfactants. Encyclopedia Microbiol. 2e éd. 1: 618–635.

[55] Pacwa-Plociniczak, M.; Plaza, G. A.; Piotrowska-Seget, Z.; Cameotra, S. S., Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences* 2011, 12 (1), 633-654 10.3390/ijms12010633

[56]Wilson, A.J. (1996) "Foams, Surfactant Sciences Series" Vol. 57, Ed. Marcel Dekker, New York

[57] Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu Z. 1991. Solubilisation of polycyclic aromatic hydrocarbon in micelar nonionic surfactant solution, Environ.Sci. Technol, 25(1), 127-133.

[58] Atamalekia, A., Sadani, M., Raoofi, A., Miri, A., Bajestanie, G. S., Fakhri, Y., et al. (2020). The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in eggs: a global systematic review, meta-analysis and probabilistic health risk assessment. Trends in Food Sci.Technol. 95, 1–9. doi: 10.1016/j.tifs.2019.11.003.

[59]Pattanathu K.S.M. Rahman and Edward Gakpe, 2008. Production, Characterisation and Applications of Biosurfactants-Review. Biotechnology, 7: 360-370

[60]Sarubbo, L. A., Sobrinho, H. B. S., Luna, J. M., Rufino, R. D., & Porto, A. L. F. (2013). *Assessment of toxicity of a biosurfactant from Candida sphaerica UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. Electronic Journal of Biotechnology, 16(4)*. doi:10.2225/vol16-issue4-fulltext-4

[61] Campos, J. M., Stamford, T. L. M., and Sarubbo, L. A. (2019). Characterization and application of a biosurfactant isolated from *Candida utilis* in salad dressings. Biodegradation 30, 313–324. doi: 10.1007/s10532-019-09877-8.

- [62] Euston, S. R., Molecular Simulation of Biosurfactants with Relevance to Food Systems. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2017, 28, 110-119
10.1016/j.cocis.2017.04.002
- [63] Befkadu, A. A.; Chen, Q., Surfactant-Enhanced Soil Washing for Removal of Petroleum Hydrocarbons from Contaminated Soils: A Review. *Pedosphere* 2018, 28 (3), 383-410
10.1016/s1002-0160(18)60027-x
- [64] Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), 609-618.
- [65] Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.
- [66] Makkar, R.S. & Cameotra, S.S. (2002) an update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 58: 428-434.
- [67] Kosaric, N., Sukan, F.V. 2015. Biosurfactants: production and utilization processes, technologies, and economics. 1st Edition. International Standard Book Number-13 : 978-1-4665-9670-2. 389p. 39
- [68] Dhara, P.S., Cameotra, S.S. 2013. Biosurfactants in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 1005–1016.
- [69] Hultberg M., Bergstrand K.J., Khalil S. et Alsanus B. (2008). Characterisation of biosurfactant-producing strains of fluorescent *pseudomonads* in a soilless cultivation system. *J. Antonie Van Leeuwenhoek*.
- [70] Nitschke, M., and Silva, S. S. E. (2018). Recent food applications of microbial surfactants. *Food Sci. Nut.* 58, 631–638. doi: 10.1080/10408398.2016.1208635
- [71] Mujumdar, S., Joshi, P., and Karve, N. (2019). Production, characterization, and applications of bioemulsifiers (BE) and biosurfactants (BS) produced by *Acinetobacter* spp.: a review. *J. Basic Microbiol.* 59, 277–287. doi: 10.1002/jobm.201800364
- [72] Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., and Alara, O. R. (2018). Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnol. Res. Innov.* 2, 81–90. doi: 10.1016/j.biori.2018.09.001
- [73] Salek, K., and Euston, S. R. (2019). Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochem.* 85, 143–155. doi: 10.1016/j.procbio.2019.06.027

[74] Pessôa M. G., Vespermann K. A. C., Paulino B. N., Barcelos M. C. S., Pastore G. M., Molina G. (2019). Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 37 319–339. 10.1016/j.biotechadv.2019.01.007

[75] Kiran, G. S., Priyadharsini, S., Sajayan, A., Priyadharsini, G. B., Poulouse, N., and Selvin, J. (2017). Production of lipopeptide biosurfactant by a marine *Nesterenkonia* sp. and Its Application in Food Industry. *Front. Microbiol.* 8:1138. doi: 10.3389/fmicb.2017.01138

[76] Zouari, R., Besbes, S., Ellouze-Chaabouni, S., and Ghribi-Aydi, D. (2016a). Cookies from composite wheat–sesame peels flours: dough quality and effect of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant addition. *Food Chem.* 194, 758–769. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.08.064

[77] Pinto M I S, Campos Guerra, J.M.; Meira, H.M.; Sarubbo, L.A.; de Luna, J.M. A Biosurfactant from *Candida bombicola*: Its Synthesis, Characterization, and its Application as a Food Emulsions. *Foods* 2022, 11, 561. <https://doi.org/10.3390/foods11040561>

[78] Kieliszek, M., Kot, A. M., Bzducha-Wróbel, A., Błazejak, S., Gientka, I., and Kurcz, A. (2017). Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: a review. *Fung. Biol. Rev.* 31, 185–198. doi: 10.1016/j.fbr.2017.06.001

[79] Stadelman, W. J. (2003). EGGS | Structure and composition. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Cambridge, MA: Academic Press.

[80] Atamalekia, A., Sadani, M., Raoofi, A., Miri, A., Bajestanie, G. S., Fakhri, Y., et al. (2020). The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in eggs: a global systematic review, meta-analysis and probabilistic health risk assessment. *Trends in Food Sci. Technol.* 95, 1–9. doi: 10.1016/j.tifs.2019.11.003

[81] Valenzuela, C. A., Baker, E. J., Miles, E. A., and Calder, P. C. (2019). Eighteen- carbon trans fatty acids and inflammation in the context of atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* 76:101009. doi: 10.1016/j.plipres.2019.101009

[82] SAIDANI F , BEICHI M , FERRADJI F.Z, EL HATTAB M , BADIS A (2021) INVENTORY FOR BIOLOGICALLY-ACTIVES SUBSTANCES (ANTIMICROBIAL, PROTEOLYTIC, HEMOLYTIC, AND BIOSURFACTANTS) OF MARINE BACTERIA ISOLATED FROM THE RED ALGAE "ASPARAGOPSIS ARMATA" *Revue Agrobiologia* (2021) 11(2): 2801-2809.

[83] BEICHI M , SAIDANI F, MECHRI S , JAOUADI B , EL HATTAB M and BADIS A (2021) ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACTINOBACTERIA FROM TWO MARINE ALGAE ASPARAGOPSIS ARMATA AND ZONARIA TOURNEFORTII WITH BIOTECHNOLOGICAL INTEREST. *Revue Agrobiologia* (2021) 11(2): 2600-2608.

[84] Satpute SK, Banpurkar AG, Dhakephalkar PK, Banat IM, Chopade BA (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30:127-144.

[85] Bezza FA, Chirwa EM. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*. 2016 Feb;144:635-44. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.08.027. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26408261.

[86] Shaghayegh Nasr, Mohammad Reza Soudi, MOHAMMAD MEHRNIA and Mohammad Hossein Sarrafzadeh, Characterization of novel biosurfactant producing strains of *Bacillus* spp. isolated from petroleum contaminated soil, November 2009 *Iranian Journal of Microbiology* 1(2):54-61.

[87] Whyte LG, Slagman SJ, Pietrantonio F, Bourbonnière L, Koval SF, Lawrence JR, Inniss WR, Greer CW. Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15. *Microbiology*. 1999;65:2961.

[88] Mokdad K. 2015. Criblage des souches bactériennes productrices de biosurfactants, optimisation de la production et caractérisation de biosurfactants en vue d'une application en agroalimentaire. Mémoire de Magister en sciences agronomiques : Nutrition et transformation des aliments. Université de Blida. 1. 94 p.

[89] Chang, J.-S., et al., *Pseudoxanthomonaskaohsiungensis*, sp. nov., a novel bacterium isolated from oil-polluted site produces extracellular surface activity. *Systematic and applied microbiology*, (2005). 28(2): p. 137-144.

[90] Taran, M., et al., *Surface active agent production from olive oil in high salt conditions and its process optimization*. *Polish Journal of Chemical Technology*, 2012. 14(4): p. 30-34.

[91] Batista, S. B., Mounteer, A. H., Amorim, F. R., Tótola, M. R., 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum-contaminated sites. *Bioresource Technology* 97, 868-875

[92] Sharma D, Saharan BS, Kapil S (2016). Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria. (Eds.) Sharma D, Saharan BS, Kapil S. Springer Briefs in Microbiology Deepansh

[93] Walter V, Syldatk C, Hausmann R (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Adv. Exper.Med. Biol.* 672:1-13.

[94] Youssef, N.H. ;Duncana, K.E. ;Naglea, D.P. ; Savagea, K.N. ; Knappb, R.M.and McInerney, M.J.Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms *J. Microbiol.Methods*,56(2004), pp. 339-347

[95] Wu, J.Y.; Yeh, K.L.; Lu, W.B.; Lin, C.L.; Chang, J.S. Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonasaeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site. *Bioresour. Technol.* 2008, 99, 1157–1164.

[96] da Rosa, C.F.C.; Michelon, M.; Burkert, J.F.M.; Kalil, S.J.; Burkert, C.A.V. Production of a rhamnolipid-type biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* LBM10 grown on glycerol. *African J. Biotechnol.* 2010, 9, 9012–9017

[97] Rekha, R.; Hemen, S.; Debahuti, D. Achieving the Best Yield in Glycolipid Biosurfactant Preparation by Selecting the Proper Carbon/Nitrogen Ratio. *J. Surfactant Deterg.* 2014, 17, 563–571.

[98] Hamzah, A.; Sabturani, N.; Radiman, S. Screening and optimization of biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria. *SainsMalaysiana* 2013, 42, 615–623

[99] Schobert, B. The Binding of a Second Divalent Metal Ion Is Necessary for the Activation of ATP Hydrolysis and Its Inhibition by Tightly Bound ADP in the ATPase from *Halobacterium saccharouorum*. *J. Biol. Chem.* 1992,267, 10252–10257.

[100] Putri, M.; Hertadi, R. Effect of glycerol as carbon source for biosurfactant production by halophilic bacteria *Pseudomonas stutzeri* BK-AB12. *Procedia Chem.* 2015, 16, 321–327

[101] Patel, R.M.; Desai, A.J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Lett. Appl.Microbiol.* 1997, 25, 91–94.

[102] Mokdad, K., Mesbaiah, F. Z., Eddouaouda, K., & Badis, A. (2016). Utilisation of agro alimentary wastes for bio surfactants production by a thermophilic bacterial strain novelty isolated from an Algerian crude oil contaminated soil. *Algerian Journal of Environmental Science and Technology*, 2(1).

[103] Panjjar N, Sachan S G and Sachan A. (2015): Screening of bioemulsifier-producing micro-organisms isolated from oil-contaminated sites. *Annala of Microbiology.* 65:753–764

[104] Haleem A, Qazi M A, Ahmed S, Larik I A, Kanhar N A and Phulpoto A H.(2018): *Stenotrophomonas maltophilia* strain 5DMD: an efficient biosurfactant-producing bacterium for biodegradation of diesel oil and used engine oil. *International J. of Environ. Science and Technology* 16:259–268

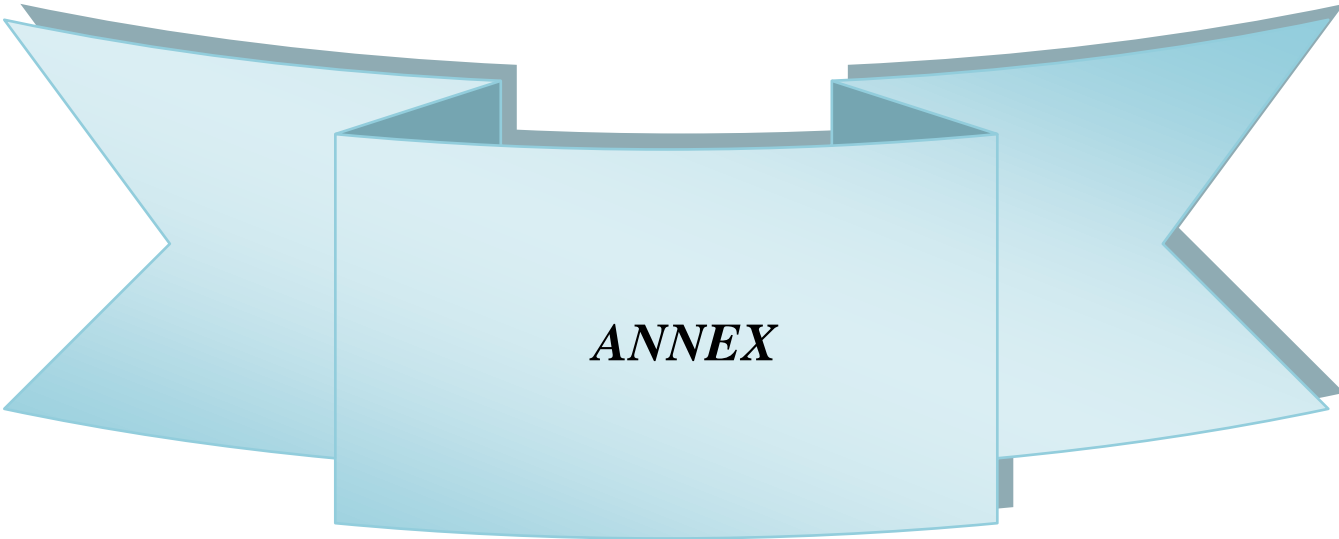
[105] Reddy G S, Mahendran B and Reddy R S. (2018): Screening and optimization of *Achromobacter xylosoxidans* GSMSR13b producing bacteria. *Asian Journal of Chemistry* 30:1424–1430.

[106] Adetunji A I and Olaniran A O. Production and characterization of bioemulsifiers from *Acinetobacter* strains isolated from lipid-rich wastewater. (2019), *3 Biotech* (2019) 9:151 <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1683-y>

[107] Pornsunthorntawe O, Arttaweeporn N, Paisanjit S, Somboonthanate P, Abe M, Rujiravanit R, Chavadej S (2008) Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochem Eng J* 42(2):172–179

[108] Zheng C, Li Z, Su J, Zhang R, Liu C, Zhao M (2012) Characterization and emulsifying property of a novel bioemulsifier by *Aeribacillus pallidus* YM-1. *J Appl Microbiol* 113(1):44–51

[109] Kiran, G.S.; Hema, T.A.; Gandhimathi, R.; Selvin, J.; Thomas, T.A.; Rajeetha Ravji, T.; Natarajaseenivasan, K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2009, 73, 250–256.



ANNEX

ANNEXE 1

1. Isolement des souches productrices de biosurfactant

Deux biotopes ont été ciblés pour l'isolement des souches bactériennes productrices des biosurfactants :

1.1.Sédiment contaminé par les hydrocarbures

Le site retenu pour le premier isolement des souches bactériennes aptes à croître dans des conditions de salinité proches à celles de l'eau de mer est le port de pêche de Khemisti (wilaya de Tipaza). Le choix de ce site est justifié par la forte contamination en produits pétroliers, essentiellement des huiles de vidange et de carburants, ce qui augmente la probabilité d'existence de ce type de microorganismes. Sachant que les microorganismes à fort potentiel de production de biosurfactants sont d'origine marine.

1.1.1 Echantillonnage

Le prélèvement a été réalisé sur la couche superficielle du sédiment, le sédiment a été prélevé dans des récipients en polypropylène stériles. Le transport des échantillons jusqu'au laboratoire a été effectué dans une enceinte thermostatée à 4°C. Cette partie du travail a été réalisée par la doctorante Mme HADJALA Soumia, membre de l'équipe de biomolécules du Laboratoire de Recherche de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (Université Blida 1).

1.1.2. Isolement

Afin de sélectionner les populations bactériennes, nous avons utilisé la méthode d'enrichissement, qui consiste à inoculer le consortium microbien du sédiment dans le milieu minimum, dont le pétrole brut est la seule source de carbone et d'énergie. Des repiquages successifs ont été réalisés périodiquement.

Une quantité de 10 g de sédiment, prélevée à l'aide d'une spatule stérile, est ajoutée dans un volume de 100 mL de milieu minimum. Le contenu est agité au vortex pendant 2 min pour libérer le consortium bactérien du sédiment. Le pétrole brut est additionné au milieu à raison de 1% (v/v). Le milieu de culture est incubé à 30°C sous une agitation de 150tr/min.

Un témoin sans inoculum est ainsi préparé. A la fin de cette étape, des dilutions décimales sont préparées à partir de 1 mL d'inoculum de la suspension bactérienne. Un volume de 0,2 mL de chaque dilution est étalé sur la surface du milieu LB. Les boîtes sont ensuite incubées à 30 °C pendant deux jours.

1.1.3. Purification

Les colonies obtenues font l'objet de purification par repiques successives sur milieux LB solides, jusqu'à l'obtention des isolats purs.

1.1.4. Conservation des isolats purifiés

a. Conservation à court terme

A l'aide d'une anse stérile, les tubes à vis contenant le milieu LB solide incliné sont ensemencés en stries par fragment de colonies des isolats purifiés. Les tubes sont incubés à 30 °C jusqu'au développement des colonies bactériennes (48 h), puis conservés à 4°C.

b. Conservation à long terme :

Une suspension bactérienne en phase exponentielle est mélangée au glycérol stérile à raison de 30% afin d'empêcher la rupture des membranes cellulaires. Le mélange (glycérol/suspensions bactériennes) est homogénéisé au vortex. Ensuite, il est conservé à une température de -40 °C.

1.2. Algues marines

Le site retenu pour le deuxième isolement des souches bactériennes était la zone du complexe Corne D'or, Tipaza. De deux types d'algues ont été utilisées pour l'isolement : une algue rouge *Asparagopsis armata* et une algue brune *Zonariatournefortii*. Cet isolement faisait partie du travail des deux doctorantes Beichi Madjeda et Saidani Fatiha, membres de l'équipe de biomolécules du Laboratoire de Recherche de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules (Université Blida 1).

1.2.2. Procédure d'échantillonnage « la récolte »

Il faut récolter les algues adultes avec les racines. Les algues doivent transporter dans l'eau de mer). L'algue complète doit être stérilement prélevée à partir du substrat avec un couteau stérilisé, et en évitant tout contact direct avec les mains, il est indispensable de porter des gants. Le matériel stérilisé doit être transporté dans une boîte stérile hermétiquement fermée.

Les algues doivent être ensuite transférées dans des sacs plastiques ou des bouteilles stériles contenant de l'eau de mer, et conservées dans l'obscurité à la température ambiante de l'eau de mer (Allant de 2 à 16°C en fonction du mois d'échantillonnage), jusqu'au traitement immédiat dans le laboratoire dans deux heures après le prélèvement.



Algue brune : *Zonariatournefortii* Algue rouge : *Asparagopsisarmata*

1.2.3. Traitement des algues

Afin d'étudier les différences potentielles dans la composition des communautés bactériennes associées à l'algue, le thalle d'algue peut être divisé en trois parties morphologiquement différentes, la fronde, le stipe et le crampon.

Les différentes parties du thalle sont rincées trois fois avec :

- Eau de mer filtrée et stérilisée pour éliminer les bactéries faiblement fixées
- Solution de tampon phosphate salin qui permet de faciliter l'élimination de l'eau de mer.

Pour préparer 1L de la solution tampon phosphate salin (PBS) il faut :

- Dissoudre les composés ci-dessous dans 800 mL d'eau distillée
 - NaCl : 8 g
 - KCl : 0,2 g
 - Na₂HPO₄ : 1,44 g
 - KH₂PO₄ : 0,24 g
- Ajuster le pH à 7,4
- Ajuster le volume à 1L avec l'eau distillée

1.2.4. Isolement et culture des microorganismes :

Isolement des bactéries à partir de l'algue entière :

Deux méthodes d'isolement sont utilisées :

- La première méthode consiste à découper l'algue en morceaux carrés et les placés directement sur les boites de Petri contenant le milieu d'isolement pour chaque microorganisme.
- La deuxième méthode consiste à découper l'algue en morceaux carrés (petits morceaux) et les trempés dans 9mL d'eau de mer filtrée et stérilisée et homogénéiser à l'aide d'un vortex (forte homogénéisation). Des dilutions de 10^{-1} à 10^{-4} sont obtenues et 100 μ L de chaque solution ainsi que les dilutions réalisées sont étalées à l'aide d'un étaloir sur les boites de Petri.

Isolement des bactéries épiphytes

La méthode consiste à frotter vigoureusement la surface de l'algue avec un écouvillon stérile, ce dernier est étalé sur les boites de Petri.

Isolement des bactéries endophytes

L'isolement de bactéries endophytes est réalisé par les mêmes méthodes utilisées pour l'isolement de l'algue entière, sauf que l'algue est traitée avec l'éthanol avant utilisation.

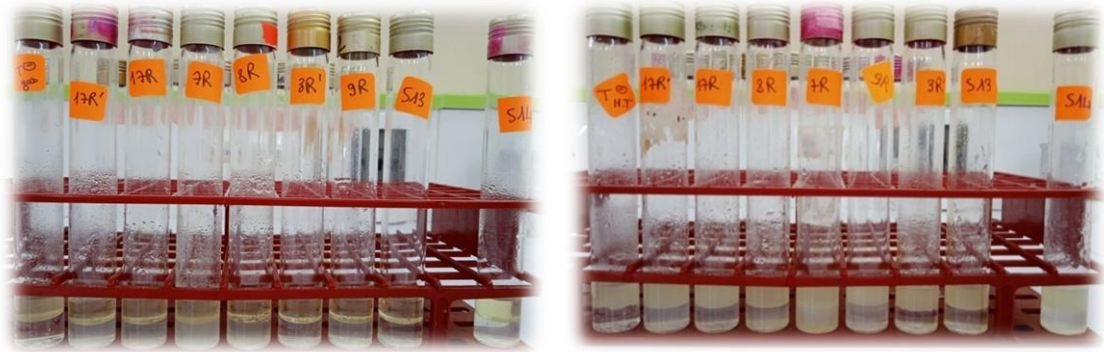
1.2.5. Purification

Les colonies obtenues font l'objet de purification par repiques successives sur milieux LBsolides, jusqu'à l'obtention des isolats purs.

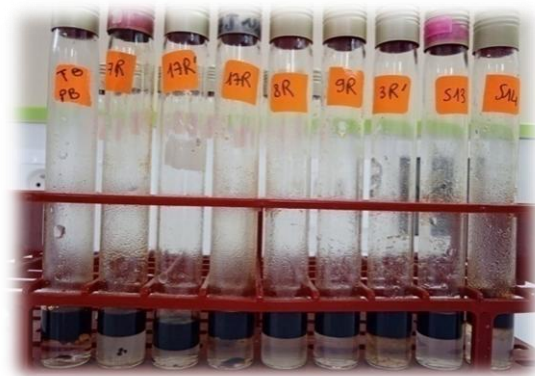
1.2.6. Conservation

- **Conservation à courte durée:** Les différents souches ont été repiquée sur des milieux solides et conservées à 4 °C.
- **Conservation à longue durée:** c'est fait dans des milieux liquides en présence de 30 % de glycérol à - 80 °C dans des cryotubes spéciale.

ANNEXE 2 :



Tube a essai de E24 pour l' huile de SOJA et gasoil



Tube a essai E24 pour huile pétrole

Verrerie utilisé:

- Erlenmeyer de 250 ml, 500ml, 1000ml, 2l, 3l

-Eprouvette graduées de, 25ml, 50ml, 100ml, 250ml, 500ml

-Tubes à essai de 20ml,

-2 Micropipettes (200 μ L ,1000 μ)

-Anse de platine,

-Pipettes Pasteur,

-Boites de Pétri en plastique (D=80mm)

-Bécher de 80ml, 100m, 250m,

-Entonnoirs

-Flacons en verre de 250ml, 500ml

-Spatules,

-Papier Filtre wattman,

-Papier Film,

-Papier Aluminium,

-Coton cardé,

-Barreau magnétique,

-Ampoule à décanter de 250ml

-Ballon de 250ml, 1000ml

Equipement utilisé :

- **Bec Bunsen**

- **Balance (ohaus carat series)**

- **Agitateur Magnétique-plaque chauffante**

- **vortex**

- **Étuve (memmert)**

- **pH mètre**

- **Autoclave ,**

- **Réfrigérateur**

- **Rotavapeur (heidolph)**

- **Centrifugeuse (SIGMA 3-16 kl)**

- **Incubateur (memmert)**

- **Agitateur Shiker**



Centrifugation



Préculture



Rotavape



appareil UV



Étuve



Balance



Incubateur



autoclave