

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire de Bioengineering & de Génie des Procédés (BIOGEP)
Mémoire de projet de fin d'études
Pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de l'Environnement

Thème

Valorisation d'un rejet pour la production de biosurfactant

Présenté par :

HAMIDI Youcef

Sous la direction de: Mme R. CHEMLAL, Maitre de Conférence A

et

Mr. N. MAMERI, Professeur

Présenté et soutenu publiquement le 01/07/2019

Composition du Jury:

Président de jury: Mr H. GRIB

Examinatrice : Mme N. ABDI

Promotrice : Mme R. CHEMLAL

Co-promoteur : Mr N. MAMERI

Professeur, ENP

Professeur, ENP

MCA, USTHB

Professeur, ENP

ENP 2019

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
ECOLE NATIONALE POLYTECHNIQUE



Département de Génie de l'Environnement
Laboratoire de Bioengineering & de Génie des Procédés (BIOGEP)
Mémoire de projet de fin d'études
Pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de l'Environnement

Thème

Valorisation d'un rejet pour la production de biosurfactant

Présenté par :

HAMIDI Youcef

Sous la direction de: Mme R. CHEMLAL, Maitre de Conférence A

Et

Mr. N. MAMERI, Professeur

Présenté et soutenu publiquement le 01/07/2019

Composition du Jury:

Président de jury: Mr H. GRIB

Examineur : Mme N. ABDI

Promotrice : Mme R. CHEMLAL

Co-promoteur : Mr N. MAMERI

Professeur, ENP

Professeur, ENP

MCA, USTHB

Professeur, ENP

ENP 2019

Dédicace

J'ai le grand honneur de dédier ce modeste travail à celle qui a donné un sens à mon existence en m'offrant une éducation digne de confiance. A ma chère mère sans elle je ne serais pas l'homme que je suis aujourd'hui.

A mon père pour son soutien moral.

A mon frère qui a su m'épauler dans le moment difficile.

A mes cher amis SOUMATIA Hocine et TAIATI Laeticia qui ont toujours été là pour moi.

A tous mes amis et camarades de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger.

A tous ceux qui ont contribué de loin ou de prêt à la réalisation de mon travail.

HAMIDI Youcef

Remerciement

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire des Biotechnologies Environnementales et Génie des Procédés du Département de Génie l'Environnement de l'Ecole Nationale Polytechnique (BIOGEP).

J'aimerais remercier par ces quelques lignes toutes les personnes qui, d'une manière ou d'une autre, ont permis à ce mémoire d'avoir lieu, tant d'un point de vue Humain que Scientifique

J'adresse mes sincères remerciements à ma promotrice Mme. R. CHEMLAL, maître de conférences A., à l'Université des sciences et de la technologie Houari Boumediene qui a proposé et dirigé ce travail. Elle s'est toujours montrée à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer.

Je remercie très chaleureusement mon co-promoteur Mr. N. MAMERI, professeur à l'Ecole National Polytechnique d'El Harrach et académicien qui a suivi de près le travail, sans oublier tous ses précieux encouragements. Je lui exprime ma gratitude de m'avoir dirigé, encouragé et surtout aidé afin de réaliser ce travail.

Je remercie vivement les membres de jury : professeur GRIB Hocine et professeur ABDI Nadia de l'Ecole Nationale Polytechnique d'Alger pour leur présence et pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes vifs remerciements vont, également, aux doctorants et mes collaborateurs du laboratoire «Mohamed, Mustapha, Yasmine, Célia et Ferial» pour leurs aides et surtout pour leurs gentillesse.

ملخص

تتناول هذه الدراسة على إنتاج منشطات السطوح الحيوية بواسطة سلالة " بسودوموناس لبيتولا " على ثلاث وسائط استزراع مختلفة (وسيط شبه اصطناعي، مصل اللبن و النفايات الصيدلانية) في وجود زيت الغاز. أظهرت مراقبة نمو البكتيريا عن طريق قياس الكثافة الضوئية عند 600 نانومتر عن طريق القياس الطيفي وقياس التوتر السطحي قدرة سلالة " بسودوموناس لبيتولا " على إنتاج منشطات السطوح الحيوية تحت ظروف مختلفة. ولدت منشطات السطوح الحيوية المنتجة في الوسط الصيدلاني انخفاضا في التوتر السطحي بنسبة 19.36% أكبر من النسبة التي تم الحصول عليها عند استخدام مصل اللبن الذي هو 6.97%. تم تخفيض تركيز الوسط الصيدلاني الى نسب مختلفة من أجل دراسة تأثير التركيز على إنتاج جزيئات السطح.

الكلمات المفتاحية: منشطات السطوح الحيوية, مصل اللبن, " بسودوموناس لبيتولا", زيت الغاز

Abstract:

This study deals with the production of biosurfactant by the *Pseudomonas luteola* bacterial strain on three different culture media (semi-synthetic medium M1, whey and a pharmaceutical waste waters) in the presence of gasoil.

The monitoring of bacterial growth by turbidimetry by measuring the optical density at 600 nm by spectrophotometry and the surface tension clearly showed the ability of *Pseudomonas luteola* to produce biosurfactants at various conditions of culture medium. The biosurfactant produced in the pharmaceutical medium generated a decrease in the surface tension with a percentage of 19.4% greater than the percentage obtained when using whey which is 7.0%. The pharmaceutical rejection is diluted at various percentages ranging from 5% to 100%, in order to study the effect of the concentration on the biosurfactant production. The best result inducing the great reduction of the surface tension value is obtained at the dilution of 30% with the pharmaceutical waste water.

Key words: Biosurfactant, *Pseudomonas luteola*, whey, antiscorpionic serum, gas oil.

Résumé :

Cette étude porte sur la production de biosurfactant par la souche bactérienne *Pseudomonas luteola* sur trois milieux de culture différents (milieu semi-synthétique M1, le lactosérum et un rejet pharmaceutique) en présence de gasoil.

Le suivi de la croissance bactérienne par turbidimétrie en mesurant la densité optique à 600 nm et la tension superficielle ont clairement démontré la capacité de *Pseudomonas luteola* à produire des biosurfactants sous différentes conditions du milieu de culture. Le biosurfactant produit dans le milieu pharmaceutique a engendré une diminution de la tension superficielle avec un pourcentage de 19,4% supérieure au pourcentage obtenu lors de l'utilisation de lactosérum qui est de 7.0%. Le rejet pharmaceutique est dilué à différents pourcentages allant de 5% à 100% et cela afin d'étudier l'effet de la concentration sur la production du biosurfactant. Le meilleur résultat pour la diminution de la tension superficielle est obtenu pour une concentration de 30% avec le rejet pharmaceutique.

Mots clés : Biosurfactant, *Pseudomonas luteola*, lactosérum, sérum antiscorpionique, gasoil.

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale	11
Chapitre 1 : les biosurfactants.....	12
I.1 Introduction :	13
I.2 Généralité sur les biosurfactants :	13
I.2.1 Définition :	13
I.2.2 Les propriétés physico-chimiques des biosurfactants :	14
I.2.2.1 Concentration micellaire critique (CMC) :	14
I.2.2.2 Tension superficielle :	15
I.2.2.3 Tension interfacielle :	15
I.2.2.4 Équilibre hydrophile-lipophile (EHL) :	16
I.2.2.5 Solubilité des biosurfactants dans l'eau :	16
I.2.3 Classification des biosurfactants :	16
I.2.3.1 Glycolipides :	17
I.2.3.2 Lipopeptides :	17
I.2.3.3 Acides gras :	18
I.2.3.4 Phospholipides :	18
I.2.3.5 Biosurfactants polymères :	19
I.2.4 Caractéristiques des biosurfactants :	21
I.2.4.1 Avantage :	21
I.2.4.2 Inconvénients :	21
I.2.5 Les applications des biosurfactant :	22
I.2.5.1 Applications environnementales :	22
I.2.6 Les micro-organismes producteurs des biosurfactants :	24
I.2.7 Facteurs influençant la production de biosurfactants :	26
I.2.7.1 Facteurs nutritionnels :	26
I.2.8 Les Facteurs environnementaux :	29
I.2.8.1 Le pH :	29
I.2.8.2 L'aération :	29
I.2.8.3 La vitesse d'agitation :	29
I.2.8.4 .La température :	30
I.2.9 Isolation et caractérisation des biosurfactants :	30
I.2.9.1 Purification et extraction du biosurfactant :	30
I.2.9.2 Identification des biosurfactants :	30

I.2.10	Ingénierie métabolique pour la production de biosurfactants :.....	31
I.3	Valorisation des rejets industriels pour la production de biosurfactants :	31
I.3.1	Valorisation des effluents industriels pour la production de biosurfactants :.....	31
I.3.2	Le lactosérum :.....	32
I.3.3	Sérum antiscorpionique :	33
I.3.1.1	Production du sérum antiscorpionique :	33
I.3.1.2	Valorisation du sérum antiscorpionique:	34
Chapitre 2: matériel et méthodes		35
II.1	Matériels :	36
II.1.1	Produit biologique :	36
II.1.2	Les effluents:.....	36
II.1.3	Produits non biologiques :	37
II.2	Méthodes :	37
II.2.1	Analyse physico-chimique des rejets :	37
II.2.1.1	Mesure des paramètres globaux :.....	38
II.2.1.2	Dosage des Chlorures par méthode de Mohr (AFNOR T90-014) :	39
II.2.1.3	Dosage des Orthophosphates par méthode spectrophotométrie (Norme NF EN 1189) :	39
II.2.1.4	Dosage des ions sulfate par la méthode turbidimétrique :	39
II.2.1.5	Dosage des sucres réducteurs :	39
II.2.1.6	Dosage des Protéines par la méthode de Bradford:	40
II.2.1.7	Dosage des paramètres globaux liés à la pollution organique :	40
II.2.1.8	Dosage des paramètres liés à la pollution azotée :.....	41
II.2.2	Production de biosurfactant :.....	41
II.2.2.1	Production de biosurfactants sur un milieu semi-synthétique M1:	42
II.2.2.2	Production de biosurfactants sur des rejets industriels (pharmaceutique et agroalimentaire) :	42
Chapitre 3: Résultats et discussion.....		45
III.1	Production de biosurfactant :	46
III.1.1	Production de biosurfactant sur milieu M1:	46
III.1.1.1	Cinétique de la croissance bactérienne :	46
III.1.1.2	Mise en évidence de la production de biosurfactants :	47
III.2	Caractérisation du lactosérum :	49
III.1.2	Production de biosurfactant sur un rejet agroalimentaire	51
III.1.2.1	Cinétique de la croissance bactérienne :	51
III.1.3	Production de biosurfactants sur un rejet pharmaceutique:	54

III.1.3.1	Production sur le rejet pharmaceutique à l'état brut:	55
III.1.3.2	Production des biosurfactants sur un milieu contenant 60% de rejet pharmaceutique :	57
III.1.3.3	Production des biosurfactants sur un milieu contenant 30% de rejet pharmaceutique :	59
III.1.3.4	Production des biosurfactants sur un rejet contenant 15% du rejet pharmaceutique :	61
III.1.3.5	Production des biosurfactants sur un milieu contenant 5% du rejet pharmaceutique :	62
III.4	Comparaison de la tension superficielle sur les différents milieux de culture :	64
	Conclusion générale	66
	Reference	67

Liste des tableaux

Tableau 1 : La structure chimique des biosurfactants (Parra et al, 1989).....	20
Tableau 2 : utilisation des biosurfactants dans la dépollution des sites contaminés (Magdalena et al, 2011).....	23
Tableau 3 : Principaux types de biosurfactants ainsi que les microorganismes impliqués dans leurs productions (Kitamoto et al. 2009 ; Kiran et al (2010) ; Manivasagan et al (2014)).....	25
Tableau 4 : Diverses sources de carbone utilisées pour la production de biosurfactants par des microorganismes (Deepika et al, 2017)	27
Tableau 5 : Diverses sources d'azote utilisées pour la production de biosurfactants par des microorganismes (Deepika et al, 2017).....	28
Tableau 6 : Matériel utilisé.....	36
Tableau 7 : Composition du milieu M1	37
Tableau 8 : Résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum.....	50
Tableau 9 :Résultats des analyses physico-chimiques du rejet issu de la production de sérum antiscorpionique.....	54
Tableau 10 : Influence de la composition des milieux de culture sur la tension superficielle.	64

Liste des figures

Figure 1: Arrangements Supra-moléculaire possibles des biosurfactants(FIECHTER, 1992). (a) monomère constitué d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe ,(b) micelle sphérique usuelle ,(c) micelle tubulaire, (d) couche micellaire (e) vésicule ou liposome.	15
Figure 2 : Structure de Rhamnolipide et Sorpholipides (Desai et Banat, 1997).	17
Figure 3:La structure de la surfactine lipopeptidique produit Bacillus subtilis (Desai et Banat 1997).	18
Figure 4 : Structures majoritaires des acides gras(Zajic et Mahomedy, 1984).	18
Figure 5: Structure de la phosphatidylethanolamine, un biosurfactant produit par Acinetobacter sp. R1 et R2 sont des chaînes hydrocarbonées d'acide gras (Desai et Banat 1997).	19
Figure 6: Structure d'un émulsifiant (Desai et Banat 1997).	19
Figure 7 : La cinétique de croissance de P. LUTEOLA sur milieu M1.	46
Figure 8:Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu M1	47
Figure 9:Représentation du taux d'émulsification (E24) des biosurfactants produits par P.luteola sur milieu M1.	48
Figure 10:Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur milieu M1.	48
Figure 11:Cinétique de croissance de P. luteola sur le lactosérum.	51
Figure 12:Evolution du pH au cours de la fermentation sur le lactosérum.	52
Figure 13:Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur le lactosérum.	52
Figure 14:Cinétique de croissance de P. luteola sur le rejet pharmaceutique à l'état brut.	55
Figure 15:Evolution du pH cours de la fermentation sur le rejet pharmaceutique à l'état brut.	56
Figure 16:Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur le rejet pharmaceutique à l'état brut.	56
Figure 17:cinétique de croissance de p. luteola sur un milieu contenant 60% de rejet pharmaceutique.	57
Figure 18:Evolution du ph cours de la fermentation sur milieu contenant 60% du rejet.	58
Figure 19:Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur milieu contenant 60% du rejet.	58
Figure 20:Cinétique de croissance de P. luteola sur milieu contenant 30% de rejet pharmaceutique.	59
Figure 21:Evolution du pH cours de la fermentation sur milieu contenant 30% de rejet pharmaceutique.	60
Figure 22: Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur milieu contenant 30% de rejet pharmaceutique.	60
Figure 23:Cinétique de croissance de P. luteola sur milieu contenant 15% de rejet pharmaceutique.	61
Figure 24: Evolution du pH cours de la fermentation sur milieu contenant 15% du rejet pharmaceutique.	61
Figure 25:Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur milieu contenant 15% de rejet.	62
Figure 26:Cinétique de croissance de P. luteola sur milieu contenant 5% de rejet pharmaceutique.	62
Figure 27: Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu contenant 5% du rejet.	63
Figure 28:: Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur un milieu contenant 5% du rejet pharmaceutique.	64

Liste des abréviations

AFNOR : Association Française de Normalisation.

CMC : Concentration Micellaire Critique.

COT : Carbone Organique Total.

DBO₅ : Demande Biochimique en Oxygène après 5 jours.

DCO : Demande Chimique en Oxygène.

DO : Densité Optique.

EHL : Équilibre Hydrophile-Lipophile.

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

He : Hauteur de l'émulsion.

HPLC : Chromatographie en phase Liquide à Haute Performance.

Ht : Hauteur totale.

MES : Matières En Suspension.

MS : Matières Sèches.

pH : Potentiel d'Hydrogène.

TS : Tension superficielle.

.

Les surfactants sont des molécules tensioactives aux propriétés amphiphiles qui sont soit synthétisés chimiquement ou bien produits par certains microorganismes. Pour ce dernier type, on les dénomme les biosurfactants.

L'utilisation de surfactant chimique peut avoir des conséquences négatives sur l'environnement à cause de leur toxicité et de leur non biodégradabilités. Les biosurfactants offrent alors une alternative intéressante vu leur faible impact environnemental ainsi que leurs propriétés physico-chimiques intéressantes. Ces dernières, sont comparables sinon meilleures à celles obtenues par la voie chimique (**Banat et al, 2000**). Cependant, ces biomolécules ne peuvent pas concurrencer les tensioactifs synthétiques, en raison du coût associé à leur production. Sous cette optique, plusieurs recherches ont été réalisées sur des substrats bons marchés (généralement des rejets industriels) et cela afin d'élucider les voies métaboliques impliquées dans la production des biosurfactants (**Raza et al, 2005**).

La diversité de la composition des biosurfactants est due essentiellement aux types de microorganismes producteurs (bactéries, champignons et levures) et à la composition des milieux de culture. Compte tenu de leur diversité, les biosurfactants pourraient avoir une large gamme d'applications dans différents domaines (pharmaceutique, santé, environnemental et agroalimentaire). En effet ces produits sont dotés de propriétés exceptionnelles telles que les effets de détergence, de mouillage, d'émulsification, de solubilisation, de dispersion et de moussage (**Banat et al, 2000; Singh et Cameotra, 2004 ; Mukherjee et al, 2006; ErumShoeb et al, 2013**).

L'objectif du présent travail est la valorisation des rejets industriels l'un issu de l'industrie agroalimentaire (Lactosérum) et l'autre de l'industrie pharmaceutique pour produire des biosurfactants par la bactérie *Pseudomonas luteola*.

Chapitre 1: Les biosurfactants

I.1 Introduction :

Le savon a été le premier tensioactif fabriqué, dont une recette de préparation a été retrouvée sur des tablettes sumériennes (une pâte savonneuse à base de graisse animale, telle que la graisse de porc et de carbonate de potassium), est resté une longue période un produit de luxe, et leur emploi est bien documenté dans les civilisations égyptiennes, phénicienne, grecque et romaine (**Ontiveros, 2014**). En 1971, une substance produite par *Pseudomonas aeruginosa* qui stimulait la croissance sur le n-hexadécane a été découverte. La substance avait des propriétés tensioactives et émulsionnantes et fut identifiée comme un rhamnolipide. Depuis, la littérature souligne le lien entre la croissance microbienne sur des substrats insolubles et la production de biosurfactants (**Comeau, 1999**).

I.2 Généralité sur les biosurfactants :

I.2.1 Définition :

Les biosurfactants (également appelé surfactant microbien) constituent un groupe hétérogène de molécules tensioactives synthétisées principalement par des microorganismes. Ils sont soit sécrétés de manière extracellulaire, soit liés à des parties de cellules (**Desai et Banat 1997**).

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles, présentant à la fois des fractions :

- **Hydrophiles polaire** fréquemment une chaîne hydrocarbonée (un glucide, un acide carboxylique, un phosphate, un acide aminé, un peptide cyclique ou un alcool). La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types de groupement : cationique, anionique, amphotères zwitterioniques et les non-ionique (**West et Harwell, 1992**) ;
- **Hydrophobes apolaire** apparaît sous de nombreuses variantes (acides gras saturés, non saturés ou hydroxylés). Elle influe sur la chimie du biosurfactant par son groupement aromatique, son nombre de carbones ou son degré de ramification (**West et Harwell, 1992 ; Desai et Banat 1997**).

I.2.2 Les propriétés physico-chimiques des biosurfactants :

La présence des molécules amphiphiles aide les biosurfactants à se déplacer vers les interfaces pour réduire la surface et la tension superficielle et interfaciale. Ces propriétés font des biosurfactants d'excellents agents de détergence, émulsifiants, moussants et dispersants **(Georgiou *et al*, 1992 ; Mukherjee et Das 2009)**. De nombreuses propriétés physico-chimiques caractérisent les surfactants synthétiques ou biologiques **(Zajic et Seffens, 1984)**. Les cinq suivantes seraient particulièrement importantes :

I.2.2.1 Concentration micellaire critique (CMC) :

Une des principales caractéristiques des biosurfactants est leur aptitude à former des agrégats moléculaires appelés micelles: un arrangement thermodynamiquement stable de molécules amphiphiles sous la forme d'une sphère possédant un extérieur hydrophile et un intérieur hydrophobe **(Figure 1)**. Les micelles ont un diamètre d'environ 3 nm **(Bury et Miller, 1993 ; Volkering *et al*, 1995)**.

La concentration du biosurfactant à laquelle les micelles commencent à s'agréger se nomme la concentration micellaire critique (CMC). Elle correspond à la solubilité maximale des molécules amphiphiles dans la phase aqueuse et donc à la quantité requise pour atteindre la tension superficielle la plus basse. Avant que la CMC soit atteinte, les molécules de biosurfactant existent sous une forme dissoute dans la phase liquide. Une fois la CMC dépassée, les molécules de biosurfactant supplémentaires formeront des micelles et la portion dissoute restera constante, tant que les conditions physico-chimiques ne varieront pas. Des changements de température, de pH ou l'ajout d'électrolytes peuvent modifier significativement la CMC et d'autres structures supra-moléculaires comme des liposomes pourront alors se former **(Ishigami *et al*, 1987 ; Rouse *et al*, 1994)**.

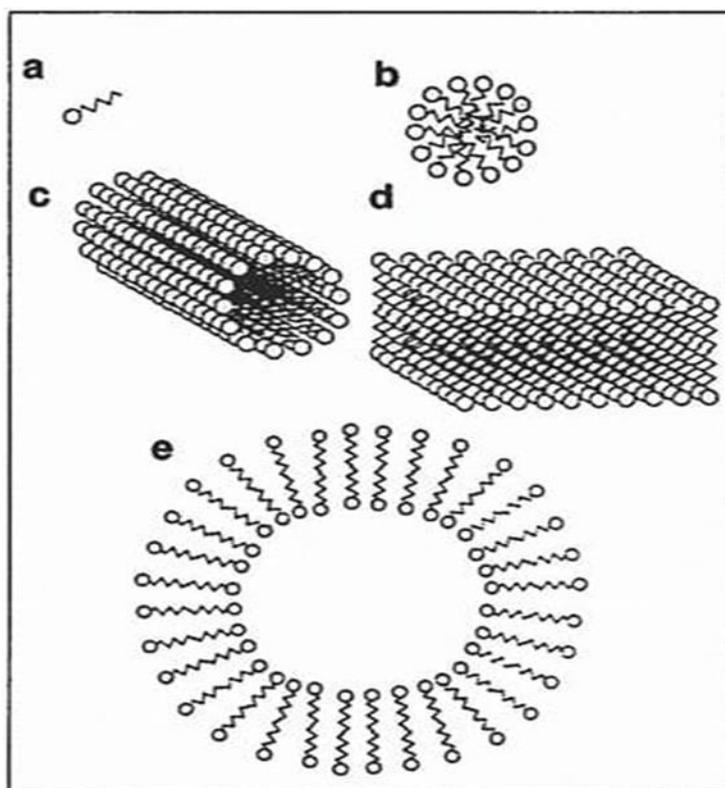


Figure 1: Arrangements Supramoléculaires possibles des biosurfactants (**FIECHTER, 1992**).
 (a) monomère constitué d'une tête hydrophile et d'une queue hydrophobe, (b) micelle sphérique usuelle, (c) micelle tubulaire, (d) couche micellaire (e) vésicule ou liposome.

I.2.2.2 Tension superficielle :

La tension de surface est une indication de la cohésion des molécules d'un liquide donc elle est définie comme étant la force existant à la surface d'un liquide dû à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de la surface (**Holmberg et al, 2001 ; Khemili, 2008 ; Zouaoui, 2017**). Les unités de la tension de surface équivalent à la force par la distance, mN/m, ce qui correspond à l'énergie par unité de surface, mJ/m² (**Zajic et Seffens, 1984**).

Les biosurfactants sont capables de réduire la tension superficielle d'eau jusqu'à 29,0 mN/m, contrairement aux surfactants synthétiques où on atteint une valeur de 42.8 mN/m pour le Pluronic F-68 (**Pornsunthorntaweea et al, 2008 ; Zouaoui 2017**).

I.2.2.3 Tension interfacielle :

La tension interfacielle est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles (**Neindre, 1993**). La tension interfacielle de l'eau contre un alcane (n-

octane) est de 50.81 mN/m à 20°C et en présence d'un biosurfactant, elle diminue jusqu'à moins de 1 mN/m (**Holmberg et al, 2002 ; Khemili, 2008**).

I.2.2.4 Équilibre hydrophile-lipophile (EHL) :

La relation entre la portion hydrophile et la portion hydrophobe d'une molécule de surfactant constitue une autre caractéristique importante. Essentiellement, le ratio de la masse de la portion hydrophile sur la masse totale de la molécule indique la valeur de l'équilibre hydrophile lipophile (EHL), laquelle augmente donc avec l'hydrophilicité de la molécule. Des surfactants avec des EHL inférieures formeront des micelles plus efficacement. La EHL peut donc servir d'indicateur de l'efficacité de la formation de micelles, de la solubilisation et émulsion des hydrocarbures, et aussi éventuellement d'indicateur de la compatibilité entre un biosurfactant et les membranes cellulaires (**Rouse et al, 1994**).

$$\text{Équilibre hydrophile – lipophile (EHL)} = \frac{\text{masse de la portion hydrophile de la molécule}}{\text{masse totale de la molécule}}$$

I.2.2.5 Solubilité des biosurfactants dans l'eau :

La solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures dépend du nombre de liaisons C-C présentes dans la partie lipophile de la molécule du biosurfactant. Si la longueur de la chaîne de la partie lipophile est inférieure à 12 liaisons C-C, le biosurfactant est soluble dans l'eau (**Mimouni, 1995 ; Khemili, 2008**).

Selon **Larpent (2000)**, la solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures est fonction de l'importance relative de leurs parties hydrophobe et hydrophile (plus précisément de leur « balance lipophile-hydrophile (HLB) (**Khemili, 2008**)).

I.2.3 Classification des biosurfactants :

La classification des biosurfactants est basée sur leurs structures, plutôt que sur la charge comme c'est le cas pour les surfactants synthétiques (**tableau 1**) (**Parra et al, 1989**).

I.2.3.1 Glycolipides :

La structure commune de ce type de biosurfactant est un groupe de tête polaire saccharidique associé à une queue hydrocarbonée (acide gras) (**Figure2**). Les saccharides peuvent être des mono-, di-, tri- ou tétrasaccharides du même microorganisme. Les plus connus des glycolipides sont les rhamnolipides, les sophorolipides, les tréhalolipides et les lipides de mannosylérythritol lipides (**Veenanadig et al, 2000 ; Chen et al, 2007**).

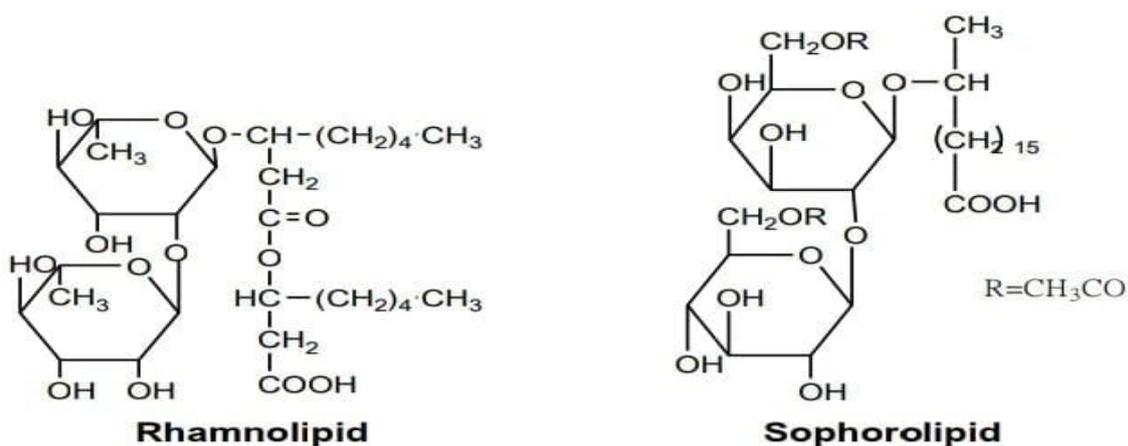


Figure 2: Structure de Rhamnolipide et Sorpholipide (**Desai et Banat, 1997**).

I.2.3.2 Lipopeptides :

La structure commune des lipopeptides est constituée d'acides aminés liés à une longue chaîne hydrocarbonée d'acides gras(**Figure3**). Il existe de nombreux types de lipopeptides produits par des microorganismes (**Roongsawang et al, 2007**).

Kakinuma et al (1969) ont isolé la surfactine produite par *Bacillus* sp. qui contenait sept acides aminés liés à des groupes carboxyle et hydroxyle d'un acide gras à 14 carbones.



Figure 3: La structure de la surfactine lipopeptidique produite par *Bacillus subtilis* (Desai et Banat 1997)

I.2.3.3 Acides gras :

La composition des acides gras contient des groupes carboxyle liés avec un hydrocarbure à longue chaîne (Figure 4). Les microorganismes qui ont produit ce type de biosurfactant sont *Capnocytophaga* sp., *Corynebacterium lepus*, *Arthrobacter paraffineus*, *Talaromyces trachyspermus* et *Nocardia erythropolis* (Ban et al, 1989).

Rehn et Reiff (1981) ont indiqué que les acides gras produits à partir d'alcanes à la suite d'oxydations microbiennes ont été considérés comme des agents de surface par mesure de la tension interfaciale. En plus des acides à chaîne droite, les micro-organismes produisent des acides gras complexes contenant des groupes -OH et des ramifications alkyle (Rehn et al, 1981).

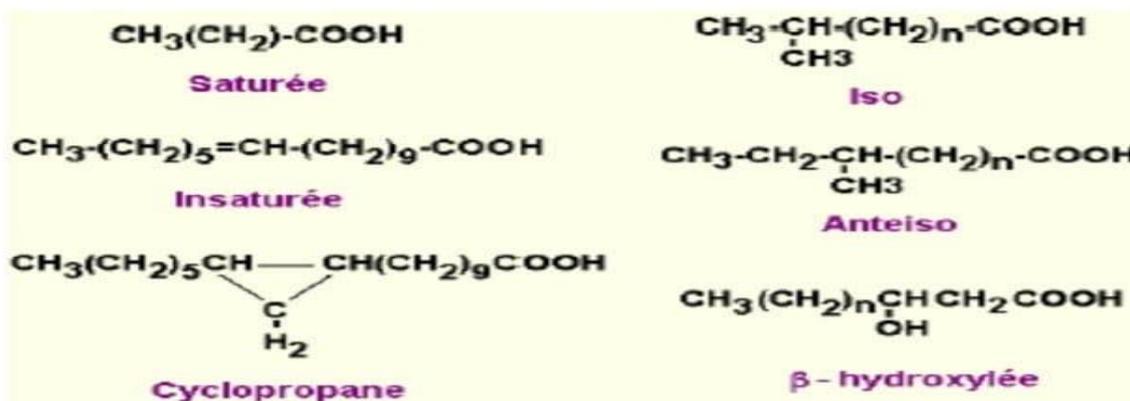


Figure 4 : Structures majoritaires des acides gras (Zajic et Mahomed, 1984).

I.2.3.4 Phospholipides :

La production quantitative de phospholipides a également été détectée chez certains *Aspergillus* sp. (Kappeli et al, 1984) et *Thiobacillus thiooxidans* (Beeba et al, 1971). Par

exemple, des vésicules riches en phospholipides ont été produites par *Acinetobacter* sp. cultivé sur hexadécane (Kaeppli *et al*, 1979) (Figure5). Phosphatidyléthanolamine également produite par *Rhodococcus erythropolis* cultivé sur du n-alcane (Rahman *et al*, 2008).

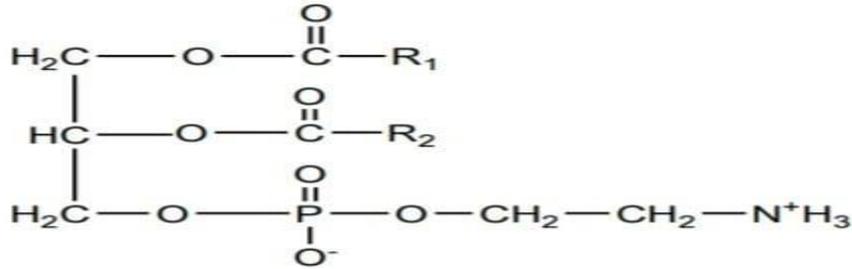


Figure 5: Structure de la phosphatidylethanolamine produite par *Acinetobactersp.* R1 et R2 sont des chaines hydrocarbonées d'acide gras (Desai et Banat 1997).

1.2.3.5 Biosurfactants polymères :

Ces biosurfactants peuvent être à base de glucides et/ou de protéines. Il est lié à des lipides. Ces polymères ont un poids moléculaire élevé (Figure6). Les émulsifiants, liposols, mannoprotéines, complexes polysaccharides-protéines, biodispersants, alasants, émulsifiants alimentaires, complexes protéiques et émulsifiants insecticides appartiennent au groupe des biosurfactants polymères (ErumShoeb *et al*, 2013).

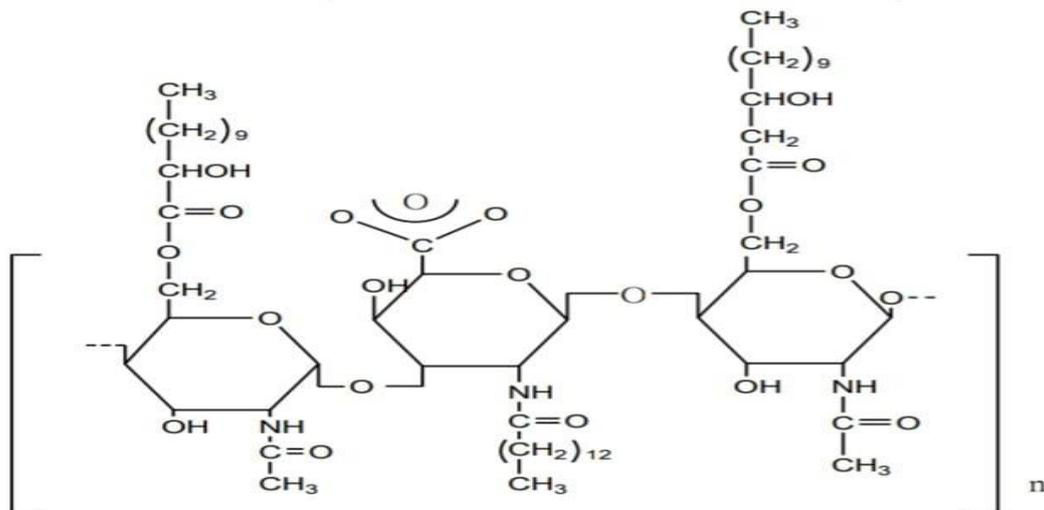


Figure 6: Structure d'un émulsifiant (Desai et Banat 1997).

Tableau 1: La structure chimique des biosurfactants (Parra et al, 1989).

Biosurfactant	Fraction hydrophile	Fraction hydrophobe
Glycolipides :	Saccharide	Chaîne hydrocarbonée d'acide gras.
➤ Rhamnolipides	Rhamnose	Chaîne hydrocarbonée de l'acide 3-hydroxy gras.
➤ Sophorolipides	Sophorose	Chaîne hydrocarbonée de l'acide gras hydroxylé.
➤ Tréhalolipides	Tréhalose	Chaîne hydrocarbonée de l'acide mycolique.
➤ Mannosylérythritol lipides	4-O- (mono ou di-O-acétyldiO-alcanoylD'mannopyranosyl) – érythritol.	Chaîne hydrocarbonée d'acide gras.
Lipopeptides	Amino acide	Chaîne hydrocarbonée d'acide gras.
Acide gras	groupe carboxyle	Chaîne hydrocarbonée d'acide gras.
Phospholipides	Groupe phosphate	Chaîne hydrocarbonée d'acide gras.
Biosurfactants polymères	saccharide répétitif et / ou protéine répétée	Chaîne hydrocarbonée d'acide gras.

Dans un autre aspect, les biosurfactants sont également classés en fonction de leurs masses moléculaires en deux groupes (Lee et al, 2008) :

- **Les biosurfactants de faible masse moléculaire**, qui réduisent efficacement la tension superficielle et interfaciale (les glycolipides, les lipopeptides et les phospholipides) ;
- **Les biosurfactants de masse moléculaire élevée**, très efficaces en tant qu'agents stabilisants des émulsions (les hétéro-polysaccharides poly-anioniques renferment à la fois des polysaccharides et des protéines) (ErumShoeb et al, 2013 ; Zouaoui ,2017).

I.2.4 Caractéristiques des biosurfactants :

I.2.4.1 Avantage :

Les propriétés physico-chimiques des biosurfactants comme la diminution de la tension superficielle et interfacielle, la formation d'agrégats et de micelles, la tolérance à la chaleur et au pH se comparent aux surfactants synthétiques (**Georgiou et al, 1992**). Ils possèdent cependant plusieurs avantages (**Hisatsuka et al, 1971; Itoh et Suzuki, 1972 ; Haferburg et al, 1986 ; Oberbremer, 1990 ; Falatko et Novak, 1992 ; Müller-Hurtig et al, 1993 ; Makkar et Cameotra, 2002; Pornsunthorntaweewa et al, 2008 ; Suwansukho et al, 2008 ; Klosowska-Chomiczewska et al, 2011 ; ErumShoeb et al, 2013**) :

- *biodégradables ;*
- *faible toxicité ;*
- *CMC souvent faible ;*
- *spécificité pour le substrat;*
- *efficacité en conditions extrêmes de pH et de température ;*
- *effet de la stimulation et de la dégradation souvent limité à l'organisme producteur ;*
- *utilisation dans le contrôle de la pollution ;*
- *variété de structures et caractéristiques;*
- *possibilité de production à partir de substrats renouvelables;*
- *possibilité de les modifier biologiquement ou chimiquement;*

I.2.4.2 Inconvénients :

Ils sont liés à la production à grande échelle et au coût élevé. Actuellement, l'utilisation de biosurfactants dans des procédés de dépollution est principalement limitée par leur coût de production élevé. L'étude de nouvelles conditions de production (différentes souches et différents substrats) ainsi que de nouveaux biosurfactants est alors requise (**Mercade et Manresa, 1994 ; Makkar et Cameotra, 2001**).

I.2.5 Les applications des biosurfactant :

Les biosurfactants ont une large gamme d'applications biotechnologiques dans le pétrole, les aliments, les boissons, les cosmétiques, les détergents, les textiles, les peintures, les mines, la cellulose, les produits pharmaceutiques et les nanotechnologies (**Rodrigues *et al*, 2006 ; Magdalena *et al*, 2011**).

I.2.5.1 Applications environnementales :

En raison de ses propriétés physicochimiques, de sa faible toxicité et de sa bonne biodégradabilité, les biosurfactants sont largement utilisés dans les techniques de protection de l'environnement (**Tableau 2**).

I.2.5.1.1 Bioremédiation des sols contaminés par des hydrocarbures :

La production et l'utilisation étendues d'hydrocarbures ont entraîné une contamination généralisée de l'environnement par ces produits chimiques. En raison de leur toxicité, de leur influence persistante et négative sur les organismes vivants, il est important de nettoyer les sites pollués (**Tableau 2, Magdalena *et al*, 2011**).

Tableau 2 : utilisation des biosurfactants dans la dépollution des sites contaminés
(Magdalena *et al*, 2011)

Classe de biosurfactant	Applications en biotechnologie environnementale	Référence
Rhamnolipides	Amélioration de la dégradation et de la dispersion de différentes classes d'hydrocarbures; émulsification d'hydrocarbures et d'huiles végétales; élimination des métaux du sol	Sifour <i>et al</i> (2007) Maier <i>et al</i> (2000)
Trehalolipides	Amélioration de la biodisponibilité des hydrocarbures	Franzetti <i>et al</i> (2010)
Sophorolipides	Récupération des hydrocarbures à partir de la lie et des boues; élimination des métaux lourds des sédiments; amélioration de la récupération du pétrole	Whang <i>et al</i> (2008) Pesce <i>et al</i> (2002)
Acide corynomycologique	Amélioration de la récupération du bitume	Hong <i>et al</i> (1998)
Surfactine	Amélioration de la biodégradation des hydrocarbures et des pesticides chlorés; élimination des métaux lourds d'un sol, des sédiments et de l'eau contaminés; augmenter l'efficacité de la phytoextraction	Jennema <i>et al</i> (1983)
Biodispersan	Dispersion de calcaire dans l'eau	Rosenberg <i>et al</i> (1988)

L'utilisation de biosurfactants est une méthode prometteuse pouvant améliorer l'efficacité de la biorémediation dans des environnements contaminés par des hydrocarbures. Ils peuvent améliorer la biorestauration des hydrocarbures par deux mécanismes. Le premier inclut l'augmentation de la biodisponibilité du substrat pour les microorganismes, tandis que le second implique une interaction avec la surface cellulaire qui augmente l'hydrophobicité de la surface, permettant aux substrats hydrophobes de s'associer plus facilement aux cellules bactériennes (Mulligan *et al*, 2004 ; Magdalena *et al*, 2011). En réduisant les tensions superficielles et interfaciales. Les biosurfactants augmentent les surfaces des composés

insolubles, ce qui augmente la mobilité et la biodisponibilité des hydrocarbures. En conséquence, les biosurfactants améliorent la biodégradation et l'élimination des hydrocarbures (**Nievas et al, 2008**).

I.5.1.1.2 Bioremédiation des sols contaminés par des métaux lourds :

La contamination des sols par les métaux lourds est très dangereuse pour l'homme et les autres organismes vivants de l'écosystème. En raison de leur nature extrêmement toxique, la présence de faibles concentrations de métaux lourds dans les sols a des conséquences graves (**Magdalena et al, 2011**).

L'utilité des biosurfactants pour la bioremédiation des sols contaminés par des métaux lourds repose principalement sur leur capacité à former des complexes avec les métaux. Les biosurfactants anioniques créent des complexes avec des métaux sous une forme non ionique par liaisons ioniques. Ces liaisons sont plus solides que les liaisons du métal avec le sol et les complexes métal-biosurfactant sont désorbés de la matrice du sol à la solution du sol en raison de l'abaissement de la tension interfaciale. Les biosurfactants cationiques peuvent remplacer les mêmes ions métalliques chargés par la concurrence sur certaines surfaces chargées négativement (échange d'ions). Les ions métalliques peuvent également être éliminés des surfaces du sol par les micelles des biosurfactants. Les groupes de têtes polaires de micelles peuvent se lier aux métaux qui les mobilisent dans l'eau (**Mulligan et al, 2004 ; Magdalena et al, 2011**).

I.5.1.1.3 Le nettoyage de réservoir de stockage d'huile par les biosurfactants :

Banat et al (1991) reporte un test sur terrain dans lequel des biosurfactants produits à partir d'une souche bactérienne exclusive ont été utilisés pour tester leur capacité à nettoyer les réservoirs de stockage d'huile et à récupérer les hydrocarbures provenant des boues émulsionnées. Le test a confirmé que ces biosurfactants ont permis la récupération de plus de 90% de l'hydrocarbure piégé dans la boue (**ErumShoeb et al, 2013 ; Zouaoui 2017**).

I.2.6 Les micro-organismes producteurs des biosurfactants :

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources

de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces organismes sont, en général, des levures, des champignons ou des bactéries (**Tableau3**) (**Mulligan et al, 2001**).

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont, en général, issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Elles sont donc isolées de leur milieu naturel et sont cultivées en laboratoire. Ceci permet de faire des tests pour choisir la meilleure source de carbone et d'optimiser les milieux de culture afin d'obtenir un taux de production maximum (**Van Dyke et al, 1993**).

Tableau 3 : Principaux types de biosurfactants ainsi que les microorganismes impliqués dans leurs productions (**Kitamoto et al, 2009 ; Kiran et al, 2010 ;Saimmai et al, 2011;Xiao et al,2012 ; Manivasagan et al,2014**).

Biosurfactant	Micro-organisme	Référence
Glycolipides	<i>Nocardioides sp.</i> <i>Candida sp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Nocardiopsis lucentensis</i> <i>Streptomyces sp.</i>	Vasileva-Tonkova et Geshevaa (2005) Hirata et al (2009) Thaniyavarn et al (2006) Kiran et al (2010) Manivasagan et al (2014)
Lipopeptides	<i>Pseudomonas libanensis</i> <i>Myxococcus xanthus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Brevibacterium aureum</i>	Saini et al (2008) Xiao et al(2012) Saimmai et al (2011) Kiran et al (2010)
Acide gras	<i>Penicillium spiculisporum</i> <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Nocardia sp.</i> <i>Candida sp.</i> <i>Cladosporium sp.</i>	Ishigami et al (2000) Gerson et al (1978) Kretschmer et al (1982)
Phospholipides	<i>Rhodococcus sp.</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Mycococcus sp.</i>	Kretschmer et al (1982) Appanna et al (1995) Appanna et al (1995)
Biosurfactant polymérique	<i>Gordonia sp.</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Franzetta et al (2009) Cameron et al (1988) Karanth et al (1999)

I.2.7 Facteurs influençant la production de biosurfactants :

Les productions microbiennes de métabolites primaires ou secondaires sont régulées par la constitution génétique de la souche productrice, cependant, les facteurs nutritionnels et environnementaux jouent un rôle crucial sur la production globale du métabolite. De plus, la connaissance des mécanismes de régulation du microorganisme choisi est hautement indispensable pour la production de métabolites microbiens à grande échelle (**Deepika et al, 2017**).

Plusieurs facteurs influent sur la production de métabolites microbiens, tels que la nature des sources de carbone, d'azote et de phosphate, ions métalliques et autres additifs utilisés dans la formulation du milieu, les conditions de culture telles que le pH, la température, le taux d'agitation et la disponibilité en oxygène, la nature du microorganisme sélectionné et enfin les stratégies de fermentation adoptées pour la production à grande échelle (**Deepika et al, 2017**).

I.2.7.1 Facteurs nutritionnels :

I.2.7.1.1 La source de carbone :

La nature du substrat source de carbone influe sur le type, la qualité et la quantité de biosurfactant. La source de carbone est l'un des paramètres influençant le plus la production des biosurfactants, soit par induction, soit par diminution de la quantité produite (**Raza et al, 2007**). Plusieurs études ont révélé la production de biosurfactants par divers microorganismes sur des glucides, des substrats non miscibles à l'eau ainsi que des hydrocarbures (**Tableau 4**).

La revue bibliographique a montré que des sources de carbone solubles dans l'eau (glycérol, glucose, mannitol ou éthanol) sont utilisées pour produire des rhamnolipides, cependant, les rendements semblent être inférieurs à ceux obtenus sur des substrats insolubles (hydrocarbures, les huiles végétales) (**Khemili, 2008 ; Deepika et al, 2017**).

Singh et al (2013), ont démontré que pour la production de biosurfactant, la meilleure source de carbone dépend principalement du comportement de la souche.

Tableau 4 : Diverses sources de carbone utilisées pour la production de biosurfactants par des microorganismes (**Deepika et al, 2017**).

Micro-organisme	Biosurfactant	Source de carbone	Rendement	Référence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Glycolipide	Glucose	1.5 g/L	Guerra-Santos et al (1984)
		L'huile de maïs	46 g/L	Linhardt et al (1989)
		Huile d'olive	6.58 g/L	Thaniyavarn et al (2006)
		Saccharose	1.35 g/L	Gomathy et Senthilkumar (2013)
<i>Rhodococcus</i> sp. TW53	Lipopeptide	n-Hexadecane	3.4 g/L	Peng et al (2008)
<i>Zunongwangiaprofunda</i> SM-A87	Exopolysaccharide	Lactose	8.90 g/L	Liu et al (2011)
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. AM		Glucose	10.51 g/L	Al-Nahas et al (2011)

1.2.7.1.2 La source d'azote :

De précédents rapports suggèrent que la nature et la concentration de la source d'azote ont également affecté la production de biosurfactant (**Tableau 5**). Les conditions de limitation en azote ont augmenté la production de biosurfactants lipidiques de rhamnolipides et de sophorose. Selon **Mulligan et Gibbs (1989)**, les nitrates devraient être réduits en nitrites puis en ammoniac pour pouvoir être utilisés comme sources d'azote.

De nombreuses souches de *P. aeruginosa* utilisent des nitrates, de l'ammoniac et des acides aminés comme sources d'azote (**Mulligan et Gibbs, 1989**). Certaines sources signalent que la limitation des concentrations d'azote jusqu'à 2–3 g/L maximalise la production de rhamnolipides (**Deepika et al, 2017**).

Les observations de **Mata-Sandoval et al (2001)** ont montré que limiter les concentrations de nutriments sont non seulement importantes pour maximaliser la

production de rhamnolipides mais également pour compléter les sources d'azote pendant des intervalles de temps. Il a été rapporté que la source d'azote organique peut favoriser la croissance cellulaire, mais s'est révélée être un facteur nutritionnel défavorable pour la production de biosurfactant glycolipidique (**Kim et al, 2006**).

Tableau 5: Diverses sources d'azote utilisées pour la production de biosurfactants par des microorganismes (**Deepika et al, 2017**).

Micro-organisme	Biosurfactant	Source d'azote	Rendement	Référence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBM10	Glycolipide	Nitrate de sodium	1.42 g/L	Prieto et al (2008)
<i>Oleomonas sagaranensis</i> AT18			5.30 g/L	Saimmaiet al (2012)
<i>Leucobacter komagatae</i> 183	Lipopeptide	Glutamate monosodique	3.03 g/L	Saimmai et al (2012)
<i>Selenomonas ruminantium</i> CT2			5.02 g/L	Saimmai et al(2013a)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MB-101		peptone	6.76 g/L	Dhasayan et al (2014)

Kiran et al (2009) ont étudié le rapport carbone/azote comme l'un des facteurs les plus fondamentaux de la production de métabolites secondaires et ils ont démontré que le rapport C/N de 3: 2 (glucose / extrait de levure) entraînait la production la plus élevée en biosurfactant par *Aspergillus ustus*. Ces résultats indiquent que le rapport C/N est un paramètre essentiel pour la production du biosurfactant qui nécessite une optimisation.

I.2.7.1.3 Sels minéraux :

Un autre effet sur la production de biosurfactant est la concentration en sel qui dépend de son effet sur l'activité cellulaire (**Abu-Ruwaida et al, 1991 ; Kedidi, 2014**).

Al-Nahas et al (2011), ont signalé qu'une bactérie marine, *Pseudoalteromonas* sp. la croissance s'est accrue uniquement lorsque la concentration de NaCl a été augmentée de 10

à 30 g / L, ce qui a entraîné une augmentation de la croissance cellulaire et de la production de substances extracellulaires. Cependant, dans un rapport récent, des concentrations de NaCl allant jusqu'à 8% et un pH de 6 à 8 ont très bien fonctionné dans le cas d'une bactérie halophile *Halomonas* sp. BS4 (**Donio et al, 2013 ; Kedidi, 2014**).

I.2.8 Les Facteurs environnementaux :

Un certain nombre de rapports scientifiques décrivant les effets de la température, du pH, de la salinité, de l'aération et de l'agitation sur la production de biosurfactant (**Desai et Banat 1997 ; Zinjarde et Pant, 2002 ; Deepika et al, 2017**)

I.2.8.1 Le pH :

Des études antérieures ont révélé que la plupart des biosurfactants lipopeptidiques sont mieux produits dans des conditions acides. Par exemple, la production accrue de biosurfactant par *Bacillus subtilis* ATCC 21 332 et *Bacillus circulansa* été enregistré respectivement pour pH 6,25 et 6,5 (**Wei et al, 2004 ; Yeh et al, 2006 ; Sivapathasekaran et al, 2010b**).

I.2.8.2 L'aération :

La disponibilité de l'oxygène influe sur l'activité cellulaire pour la production des biosurfactants. Selon **Lee et al, (2001)**, les fortes aérations augmentaient généralement non seulement la production de substances extracellulaires et la viscosité du milieu de culture. La production de biosurfactants à partir de *Bacillus* sp. est un processus aérobie, nécessitant une aération pour leur croissance et la formation de leurs métabolites (**Lee et Kim, 2004 ; Deepika et al, 2017**).

I.2.8.3 La vitesse d'agitation :

L'agitation est un facteur clé pour la production de biosurfactant, qui permet de répartir l'oxygène uniformément dans le milieu et maintenir sa concentration au niveau souhaité. Des études antérieures ont révélé que *Bacillus* sp. cultivé dans un réacteur très agité donne une meilleure production de métabolites (**Joshi et al, 2008**).

Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement faible en biosurfactant. L'effet inverse est observé dans le cas des levures (**Djerbaoui, 2011 ; Deepika et al, 2017**).

I.2.8.4 .La température :

L'influence de la température est directement liée au type microbien étudié. **Yeh et al, (2006)** ont signalé une température optimale de 30 °C pour la production surfactine par *Bacillus subtilis* ATCC 21 332. **Moriello et al (2003)**, ont produit 90 mg/L de substances extracellulaires à 60 ° C par *Geobacillus* sp. 4004.

I.2.9 Isolation et caractérisation des biosurfactants :

I.2.9.1 Purification et extraction du biosurfactant :

Pour extraire le biosurfactant du milieu de croissance, il est d'abord nécessaire de séparer les bactéries de ce milieu de culture (par centrifugation par exemple). La récupération des biosurfactants dépend principalement de leur charge ionique, de leur solubilité et de leur localisation (intracellulaire, extracellulaire ou lié aux cellules). Les techniques les plus utilisées sont des extractions par solvants : chloroforme/méthanol, butanol, acétate d'éthyle, etc. ou des techniques reposant sur la précipitation du biosurfactant. Ces extractions peuvent être réalisées directement ou après sédimentation des cellules productrices. Après l'extraction, la purification par chromatographie sur colonne est la méthode la plus utilisée (la chromatographie sur gel de silice, la filtration sur gel de Sephadex, la chromatographie sur colonne et la HPLC), qui dépendent du type, des propriétés et du but de l'application du biosurfactant (**Desai et Banat, 1997**).

I.2.9.2 Identification des biosurfactants :

Une fois les biosurfactants sont purifiés, il faut déterminer leur structure. Parmi les différentes analyses qualitatives utilisées fréquemment sont :(**Spoeckner et al, 1999 ; Peypoux et al, 1999 ;Daniels et al, 1999 ;Khemili, 2008**)

- La spectrophotométrie (UV-Vis) qui détecte la présence de chromophore;
- l'infrarouge qui détermine les groupements fonctionnels

- la spectrométrie de masse qui donne le poids moléculaire, des indications sur la structure et qui à haute résolution fournit l'analyse élémentaire de la molécule ;
- la résonance magnétique nucléaire à haut champs indique la structure et la conformation des composés à analyser.

I.2.10 Ingénierie métabolique pour la production de biosurfactants :

La demande continue de la réduction du coût de production et de la génération des nouvelles molécules améliorées, a entraîné le lancement de nouveaux projets sur le bioengineering des biosurfactants. Des stratégies directes et combinatoires ont été établies pour produire des biomolécules modifiés, en particulier des dérivés lipopeptidiques. Plusieurs études ont porté sur l'ingénierie des lipopeptides, la dynamique et les nouvelles caractéristiques structurales des lipopeptides synthétisés (**Amir-Heidari et al, 2008**).

Les microorganismes produisant un ensemble de lipopeptides apparentés dont la fermentation peut être influencée par les conditions de culture (facteurs abiotiques et nutritionnelles) (**Pryor et al, 2007**). D'autres stratégies ont été développées pour la modification structurale des biosurfactants. Ces stratégies consistent soit à manipuler les voies métaboliques des précurseurs soit à provoquer des mutations touchant les enzymes impliqués dans la voie de synthèse des lipopeptides (**Powell et al, 2007**). Donnant ainsi naissance à de nouveaux produits (**Amir-Heidari et al, 2008**).

I.3 Valorisation des rejets industriels pour la production de biosurfactants :

Des millions de tonnes de déchets dangereux et non dangereux sont générés chaque année dans le monde. Les coûts de traitement et d'élimination de ces déchets représentent un lourd fardeau financier pour diverses industries et pourraient bientôt dépasser les ressources disponibles. Ainsi, il y a un grand besoin pour une meilleure gestion de ces déchets via le concept: réduire, réutiliser et recycler (**Makkar et Cameotra, 2001**).

I.3.1 Valorisation des effluents industriels pour la production de biosurfactants :

Le succès de la production de biosurfactants dépend de la mise au point des procédés moins coûteux et de l'utilisation de matières premières à faible coût, qui représentent 10 à 30% du coût total (**Cameotra et Makkar, 1998**). Un coût de production élevé peut être toléré pour un biosurfactant utilisé dans des produits cosmétiques et pharmaceutiques (à faible volume et à des prix élevés). Mais dans des applications telles que la récupération assistée du pétrole, qui nécessite des grandes volumes de tensioactifs à bas prix, les coûts élevés sont incompatibles (**Abalos et al, 2001**).

Kosaric et al (1984), ont suggéré quatre facteurs sur lesquels il faudrait se concentrer pour réduire les coûts de production des biosurfactants :

- Adaptation microorganismes sélectionnés et adaptés pour des rendements plus élevés de produits;
- Conception des procédés pour de faibles coûts d'investissement et de fonctionnement;
- Le substrat;
- Les sous-produits du processus gérés comme des produits valorisables plutôt que comme des déchets.

1.3.2 Le lactosérum :

Le lactosérum est, généralement, défini comme la partie du liquide ou du sérum de lait résiduel qui reste après la séparation du caillé à partir de la coagulation du lait par des enzymes protéolytiques ou des acides. Le lactosérum a une couleur jaune/vert, ou parfois même teinte bleuâtre, mais la couleur peut être changée avec le type de lait utilisé. Il peut être produit à partir de différents types de lait, mais le lait de vache est le plus populaire en Algérie, alors que, dans d'autres régions du monde, le lait de chèvre, de brebis et même de chameau est utilisé dans la production de fromages et de lactosérum. En effet, le lactosérum représente environ 85-95% du volume de lait et conserve environ 55% des éléments nutritifs du lait (**Voilleau, 2009 ; Laieb, 2018**).

Le lactosérum a été longtemps considéré comme un déchet. Il était soit épandu dans les champs soit utilisé pour l'alimentation animale. Dans la plupart du temps, il est rejeté dans les eaux résiduaires des usines laitières. Par sa composition riche en matière organique, son rejet dans l'environnement constitue une source de pollution à cause de sa grande demande

biologique en oxygène entre 32000 et 60000 mg d'O₂/L. Le coût de traitement du lactosérum en station d'épuration élève le prix de revient des industries laitières ainsi que l'épandage est également une destination envisagée mais les volumes annuels produits saturent vite cette solution. Enfin si on se réfère à la composition du lactosérum, on y trouve des composés d'intérêt ; d'où la possibilité de valorisation **(Audic et al, 2003 ; Laieb, 2018)**.

La production du bioéthanol à partir du lactosérum devrait donc représenter une source importante d'énergie. Cette production est basé sur la fermentation alcoolique du lactose, puisqu'il est le sucre le plus abondant dans ce coproduit, mais le plus important dans le procédé de fermentation, c'est la sélection de microorganismes qui ont une grande capacité de fermenter le lactose en éthanol dans un délai très court et en présence d'oxygène **(Gelegenis, 2007)**.

La méthanisation présente des avantages pour l'épuration des effluents très chargés comme le lactosérum, avant leur rejet en station d'épuration. Le biogaz se prête, éventuellement après épuration, à toutes les applications du gaz naturel **(Gelegenis, 2007)**.

I.3.3 Sérum antiscorpionique :

Les venins de scorpion sont des mélanges complexes de protéines qui possèdent une action biologique très spécifique. Ils contiennent des enzymes à action lytique, des molécules participant à des réactions allergiques et en priorité des neurotoxines, molécules perturbant la conduction du message nerveux en se fixant sur un site au niveau d'un canal ionique ou d'un récepteur synaptique **(Oukkache, 2008 ; Bensadallah, 2017)**.

I.3.1.1 Production du sérum antiscorpionique :

Le sérum antiscorpionique est produit à partir du venin d'*Androctonus Australis Hector*. Il est obtenu par injections répétées d'antigènes chez l'animal afin de créer une immunisation active avec sécrétion d'anticorps protecteurs chez celui-ci **(Bensadallah, 2017)**.

En général, c'est le cheval qui est utilisé, du fait de la quantité importante de sérum que l'on peut recueillir, ainsi que pour sa haute résistance au venin comparé aux autres animaux. Les chevaux sont ensuite ponctionnés et le sérum contenant les anticorps antitoxiques est séparé par coagulation du sang. Le sérum subit alors une série de traitements

physiques et chimiques (purification) basée sur une double précipitation par des sels d'ammonium et une pepsination (**Bensadallah, 2017**).

Les objectifs recherchés à travers cette purification du sérum sont doubles :

- Réduire les risques de sensibilisation induits par immunoglobulines équine
- Augmenter l'activité neutralisante du sérum

I.3.1.2 Valorisation du sérum antiscorpionique:

Dans le cadre du développement durable et du recyclage, il est intéressant de valoriser cet effluent pour le transformer en un produit à valeur ajoutée, par la récupération de la fraction saline essentiellement les sulfates d'ammonium, afin qu'elle puisse être réutilisée (**Bensadallah, 2017**).

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

Ce travail rentre dans le cadre de la préparation du diplôme d'ingénieur d'état en Génie de l'Environnement. Il a été réalisé au niveau du laboratoire « BIOGEP » à l'Ecole Nationale Polytechnique d'El Harrach et dont l'objectif est de valoriser des rejets industriels pour la production des biosurfactants.

II.1 Matériels :

Tableau 6: Matériel utilisé.

Appareil	Marque
Etuve	BUVE
Autoclave	/
Four-Pasteur	J.P.SELECTA,s.a.
Incubateur agitateur	WiseShake (SHO-2D)
Centrifugeuse à froid	/
spectrophotomètre	SHIMADZU UVmini-1240
pH-mètre	HANNA instrument
Tensiomètre	Gibertini TSD Digital Tensiometer
Vortex	TechnoKARTELL (TK3S)
Bec Bunsen	/
Conductimètre	HANNA instrument
Oxymètre	OxyTop IS 6 WTW

II.1.1 Produit biologique :

La souche qui a fait l'objet de cette étude, *Pseudomonas luteola* a été isolée à partir des sols pollués et mise à ma disposition par Docteur Radia CHEMELAL.

II.1.2 Les effluents:

a. Le lactosérum :

Le lactosérum utilisé dans ce travail provient d'une fromagerie locale de la région de Chebli wilaya de Blida.

b. Sérum antiscorpionique :

Le second effluent utilisé est issu de la production du sérum antiscorpionique de l'Institut Pasteur d'Alger.

Avant toute utilisation, les deux effluents sont bien homogénéisés.

II.1.3 Produits non biologiques :

a. Milieux de culture :

- **Milieux solides :** Gélose nutritive.
- **Milieux liquides :** Milieu M1 est un milieu semi-synthétique proposé par **Zajic et al. (1997)**.

Tableau 7: composition de milieu M1

Ingrédients	Quantité
K ₂ PO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	2g
MgSO ₄	2 g
NaCl	0,1 g
NaNO ₃	5 g
Glucose	15 g
Extrait de levure	3 g
Eau distillé	1 litre
Le pH est ajusté à 6,5.	

II.2 Méthodes :

II.2.1 Analyse physico-chimique des rejets :

La caractérisation physico-chimique est basée sur l'étude des paramètres suivants : acidité (pH), conductivité, matières en suspension (MES), matières sèches (MS), demande chimique en oxygène (DCO), demande biologique en oxygène (DBO), nitrates, nitrites, azote ammoniacal, chlorures, ortophosphates, sulfate, sucres réducteurs et les protéines.

II.2.1.1 Mesure des paramètres globaux :

II.2.1.1.1 L'acidité et la conductivité :

Le pH des échantillons a été mesuré sous agitation magnétique à l'aide d'un pH mètre de marque HANNA, modèle pH 211, calibré avec deux solutions tampon de pH 4 et 7 selon la norme **NF T90-008 (AFNOR, 2001)**. La conductivité a été mesurée à l'aide d'un conductimètre de marque **HANNA, modèle H18733**. Une mesure intégrée de la température permet une compensation automatique de la valeur de la conductivité en fonction de la température de la solution (température de référence : 25°C).

II.2.1.1.2 Les matières en suspension (MES) à 105 °C, méthode par centrifugation (norme NFT 90 – 105 02 1997) :

Les MES sont déterminées par centrifugation. Le culot obtenu est mis dans une capsule préalablement pesée puis séchée à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. La différence entre le poids de l'échantillon séché et celui de la capsule détermine le taux de MES. Il est exprimé en g/l.

II.2.1.1.3 Les matières sèches (MS) (norme NFT 90 – 029 06 1970) :

La matière sèche est constituée par l'ensemble des substances organiques et inorganiques en solution ou en suspension, contenues dans les effluents. La MS est déterminée par évaporation d'un échantillon mis dans une capsule, préalablement séchée et tarée, à 105°C pendant une nuit. La teneur en matière sèche, exprimée en g/l, est donnée par la formule suivante :

$$MS = \frac{m_1 - m_0}{V} 1000$$

MS : matière sèche en g/l.

m₁ : masse de la capsule avec effluents séchées à 105°C en g.

m₀ : masse de la capsule vide en g.

V : volume de la prise d'essai en ml.

II.2.1.2 Dosage des Chlorures par méthode de Mohr (AFNOR T90-014) :

Les chlorures sont dosés selon la norme (NF T 90-014). Les chlorures sont dosés par les nitrates d'argent en présence de chromate de potassium comme indicateur. La teneur en chlorure est déterminée en milligramme d'ion Cl⁻ suivant la formule suivante :

$$\frac{[(v-b)*1000]}{(V*k)}$$

v : volume de la solution de nitrate d'argent utilisé (ml).

b : volume de la solution de nitrate d'argent consommée par l'essai à blanc (ml).

V : volume de la prise d'essai (10ml).

k : facteur dépendant de la dilution.

II.2.1.3 Dosage des Orthophosphates par méthode spectrophotométrie (Norme NF EN 1189) :

Les ions orthophosphates en solution acide (H₂SO₄) et en présence d'ions molybdate et d'antimoine forment un complexe d'antimonyl-phosphomolybdate qui, après réduction par l'acide ascorbique, donne un complexe de molybdène fortement coloré en bleu. Le développement de la coloration est accéléré par l'utilisation d'un catalyseur, le tartrate double de potassium et d'antimoine. La mesure de l'absorbance de ce complexe se fait à 880nm et permet de déterminer la concentration en orthophosphates de l'échantillon par rapport à une gamme étalon.

II.2.1.4 Dosage des ions sulfate par la méthode turbidimétrique :

Cette méthode est basée sur le fait que les ions SO₄⁻² se précipitent en milieu acide et en présence du chlorure de baryum (BaCl₂) pour former (BaSO₄) (**Bensadallah, 2017**).

II.2.1.5 Dosage des sucres réducteurs :

Cette méthode est basée sur la formation d'un chromatophore entre le réactif DNS et les terminaisons réductrices des molécules des sucres. En effet à température élevée, en milieu basique et en présence des sucres réducteur, le réactif DNS de couleur jaune est réduit en acide 3 Amino-5-nitrosalicylique (brun), et les groupements aldéhydes des sucres sont oxydés en groupements carboxyles (**Miller GL ,1959**).

II.2.1.6 Dosage des Protéines par la méthode de Bradford:

Bradford et al (1976) ont développé une méthode basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250. En milieu éthanolique acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. C'est une méthode très sensible (2-5 µg de protéines) et très rapide. Elle est assez résistante à la plupart des interférents qui nuisent à la plupart des autres méthodes. La mesure de l'absorbance de ce complexe se fait à 595 nm et permet de déterminer la concentration en protéine de l'échantillon par rapport à une gamme étalon.

II.2.1.7 Dosage des paramètres globaux liés à la pollution organique :

II.2.1.7.1 La demande chimique en oxygène (DCO) (MA. 315-DCO 1.0) :

La demande chimique en oxygène (DCO) est la mesure de la quantité d'oxygène requise pour oxyder la matière organique et inorganique oxydable contenue dans un échantillon. La matière oxydable contenue dans un échantillon est oxydée par chauffage à reflux en milieu fortement acide avec une quantité connue de bichromate de potassium dans une éprouvette fermée. La consommation d'oxygène par l'échantillon provoque un changement de couleur dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de bichromate de potassium réduit et se mesure en équivalent d'oxygène (**C.E.A.E.Q, 2006**).

II.2.1.7.2 La demande biochimique en oxygène (DBO₅) :

La DBO₅ correspond à la masse d'oxygène moléculaire (exprimée en mg) utilisé par les microorganismes pour dégrader en cinq jours à 20°C et à l'obscurité les matières oxydables contenues dans un litre d'échantillon.

La mesure de la DBO₅ avec OxiTop® repose sur une mesure de la pression dans un système clos. C'est un système électronique à manomètre intégré qui se visse directement sur le flacon à DBO. Une lecture numérique remplace la lecture sur le manomètre à mercure. Les postes (flacons + tête) sont associés à un agitateur à induction, le tout devant être placé dans une enceinte à 20°C. Les micro-organismes qui se trouvent dans l'échantillon consomment l'oxygène en formant du CO₂. Celui-ci est absorbé avec NaOH. Il s'ensuit une dépression dont la mesure peut être lue directement dans la DBO en mg/l (**MA.315-DBO 1.1**).

II.2.1.8 Dosage des paramètres liés à la pollution azotée :

II.2.1.8.1 Dosage des nitrites (NO_2^-) :

Le dosage des nitrites est suivie par spectrophotomètre et selon la norme (**NF T90-013**), elle se base sur la réaction de diazotation de la sulfanilamide par les nitrites, en présence de dichlorure N-(1-naphtyl)-éthylène-diamine, en vue de la formation d'un complexe coloré rose dont l'intensité est mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde voisine de 537 nm.

II.2.1.8.2 Dosage des nitrates (NO_3^-) :

La Norme NF T 90 012 a servi comme méthode de dosage des nitrates. Elle se base sur la réaction des nitrates avec l'acide sulfosalicylique (formé par addition à l'échantillon, de salicylate de sodium et d'acide sulfurique), le dérivé obtenu donne, en présence d'ammoniaque, une coloration jaune stable qui peut être suivie par spectrophotométrie à une longueur d'onde voisine de 415nm.

II.2.1.8.3 Dosage de l'azote ammoniacal (la méthode au réactif de Nessler) :

Cette méthode est applicable pour des teneurs en azote ammoniacal supérieures à 0.1mg.L^{-1} . En présence d'hydroxyde de potassium ou de sodium, il se produit une réaction entre les ions NH_4^+ et le réactif de Nessler, avec formation d'un composé de coloration variant du rouge au brun. L'ajout de tartrate double de sodium et de potassium a pour rôle principal d'éviter la formation d'un trouble dû à l'interférence du calcium et du magnésium éventuellement présents dans l'eau. Les échantillons ont été dilués par un facteur de 100 ou 1000 pour porter les concentrations analytiques dans la marge du spectrophotomètre. Les mesures ont été faites à une longueur d'onde de 420 nm.

II.2.2 Production de biosurfactant :

Les essais réalisés s'articulent en deux parties :

- la première partie porte sur la production de biosurfactant dans un milieu semi-synthétique M1 en présence du gasoil ;

- la seconde partie consiste à la valorisation des effluents industriels (agroalimentaire et pharmaceutique) comme milieu de fermentation pour la production de biosurfactants.

II.2.2.1 Production de biosurfactants sur un milieu semi-synthétique M1:

Conduite de la culture :

a. Préparation de la préculture:

La souche *Pseudomonas luteola* a été cultivée sur le milieu M1. Ce dernier est inoculé par une culture bactérienne jeune cultivée sur gélose nutritive. Le gasoil stérile est additionné au milieu M1 à raison de 2%. Le tout est incubé à 30°C pendant 24 heures et sous agitation à 110 tours par minute (tpm).

b. Fermentation en erlenmeyers :

La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers de capacité 1000 ml contenant 700 ml de milieu M1 à 2% du gasoil stérile inoculé par la préculture à raison de 4%. Ces erlenmeyers sont incubés à 30°C pendant six jours, sous agitation à 110 tpm et avec aération.

Les fermentations sont réalisées en duplicata et les prélèvements sont effectués toutes les 2 heures afin d'évaluer la croissance et la production de biosurfactants.

II.2.2.2 Production de biosurfactants sur des rejets industriels (pharmaceutique et agroalimentaire) :

Dans cette partie, nous allons procéder à la valorisation des rejets pour produire du biosurfactant.

Conduite de la culture :

a. Préparation des rejets :

Avant chaque fermentation, les deux rejets sont stérilisés par la tyndallisation. Ces rejets vont servir de milieu de culture pour la production de biosurfactant par *Pseudomonas luteola*.

Le rejet issu de la production du sérum antiscorpionique est dilué à des différents pourcentages : 5%, 10%, 30%, 60% et 100%. Ce qui a permis d'étudier l'effet de la concentration sur la production du biosurfactant. Le lactosérum est utilisé à l'état brut.

b. Préparation de la préculture:

L'inoculum est préparé à partir de la souche repiquée sur milieu gélosé et incubée à 30°C pendant 24h. A l'aide d'une pipette pasteur stérile, on transfère l'inoculum dans 28 ml du rejet. Le rejet inoculé est incubé à 30°C, sous agitation à 150tpm pendant 24h.

c. Fermentation en erlenmeyers :

La précédente préculture sera transférée à raison de 4% dans des erlenmeyers de capacité 1000 ml contenant 700 ml des rejets stériles. Les cultures sont incubées à 30°C sous agitation de 110 tpm pendant 6 jours. L'aération est assurée par des pompes aquariums.

Les prélèvements sont effectués toutes les 2 heures afin d'évaluer la croissance et la production de biosurfactant.

• **Suivi de la fermentation :**

a. Mesure de la croissance :

L'étude de la croissance des souches bactériennes a été réalisée dans le but d'évaluer la production de biosurfactant au cours de la phase de croissance. Dans notre étude, la croissance a été suivie en mesurant la variation de la densité optique de la culture bactérienne (DO) à 600 nm par spectrophotomètre.

b. Test d'indice d'émulsion (E24) :

L'indice d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (le gasoil) dans une phase hydrophile (le mout de fermentation). Le test consiste à ajouter 2 ml de gasoil à 2 ml de mout de fermentation. Le tout est agité à la vitesse maximale du vortex pendant 2 minutes. Les mesures sont prises 24 heures après agitation (**Cooper et al., 1987**). L'indice d'émulsion représente la hauteur de l'émulsion formé (**He**) sur la hauteur totale du liquide dans le tube (**Ht**) multiplié par 100.

$$E24 = \frac{He}{Ht} 100$$

Ce test a été réalisé au cours de la fermentation pour mettre en évidence la production de biosurfactant.

c. La mesure de la tension superficielle :

Elle a été déterminée à l'aide d'un tensiomètre (Gibertini TSD Digital Tensiometer) et exprimée en Dyne/cm. La méthode consiste à prélever un échantillon de culture toutes les 2 heures.

d. Détermination du pH :

Le pH du milieu de culture au cours de la croissance a été mesuré sur une partie aliquote prélevée à l'aide d'un pH-mètre (HANNA pH211).

Chapitre 3 : Résultats et Discussion

III.1 Production de biosurfactant :

Les biomolécules produites dans cette étude, ce sont des biosurfactants, ils ont été produits par *Pseudomonas luteola* cultivées sur trois milieux différents (milieu semi-synthétique, rejet agroalimentaire et un autre rejet pharmaceutique) en présence du gasoil.

III.1.1 Production de biosurfactant sur milieu M1:

III.1.1.1 Cinétique de la croissance bactérienne :

La croissance bactérienne a été déterminée en suivant la densité optique (DO) à 600 nm.

Les résultats sont représentés par la figure 7.

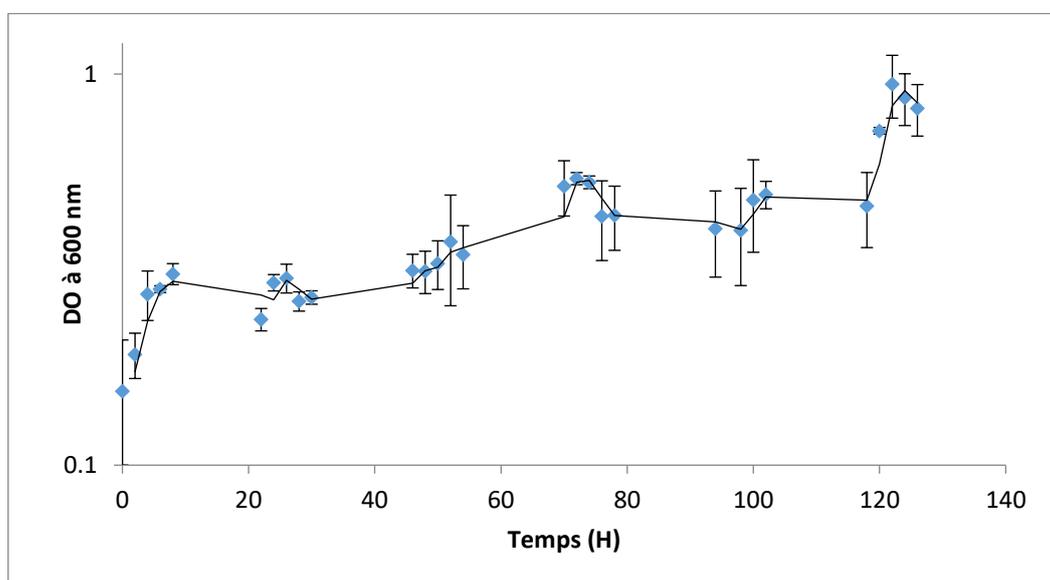


Figure 7 : La cinétique de croissance de *P.luteola* sur un milieu M1.

D'après l'allure de la courbe de croissance, nous remarquons une croissance type biphasique. Après 8 heures de phase exponentielle suivie par une longue phase stationnaire, la croissance s'arrête au bout de 70 heures de fermentation et redémarre à nouveau d'une façon exponentielle accélérée.

Cette allure peut être expliquée par la présence de deux sources du carbone (glucose et gasoil). Après avoir épuisé le glucose ($C_6H_{12}O_6$) présent dans le milieu semi-synthétique, le gasoil est utilisé comme une deuxième source de carbone d'où l'apparition d'une seconde phase de croissance.

Yu-Hong Wei et al, (2005) ont montré que l'espèce *Pseudomonas* est bien connue pour sa capacité à produire des biosurfactants à partir de plusieurs sources de carbone.

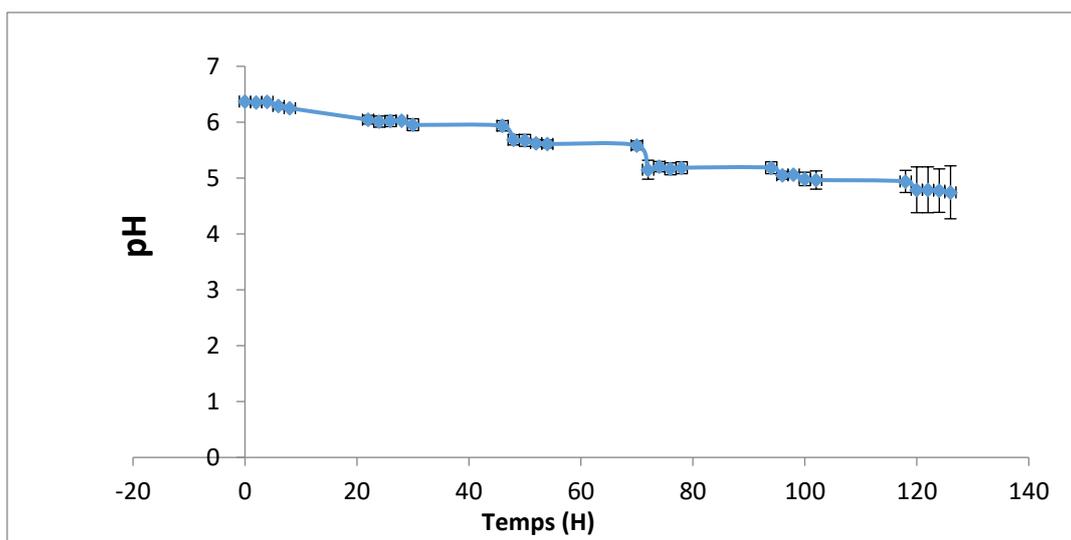


Figure 8: Evolution du pH cours de la fermentation sur milieu M1

La mesure de pH a révélé une acidification du milieu de culture durant la fermentation (figure 8), cette diminution est attribuée à la présence des acides gras, métabolites intermédiaire de la biodégradation du gasoil.

III.1.1.2 Mise en évidence de la production de biosurfactants :

Afin de mettre en évidence la production des biosurfactants par *P.luteola*, nous avons fait appel à deux méthodes (le test d'émulsification E24 et la mesure de la tension superficielle). Les résultats obtenus par ses méthodes sont représentés par les figures 9 et 10. D'après l'histogramme (Figure 9), la production du biosurfactant est obtenue après 70 heures de fermentation avec un taux de production maximal de 73,1%, ce qui correspond à la fin de la phase stationnaire. D'après **Atanasković et al (2016)**, la production de biosurfactants est très intense durant la phase exponentielle et continue jusqu'à la phase stationnaire.

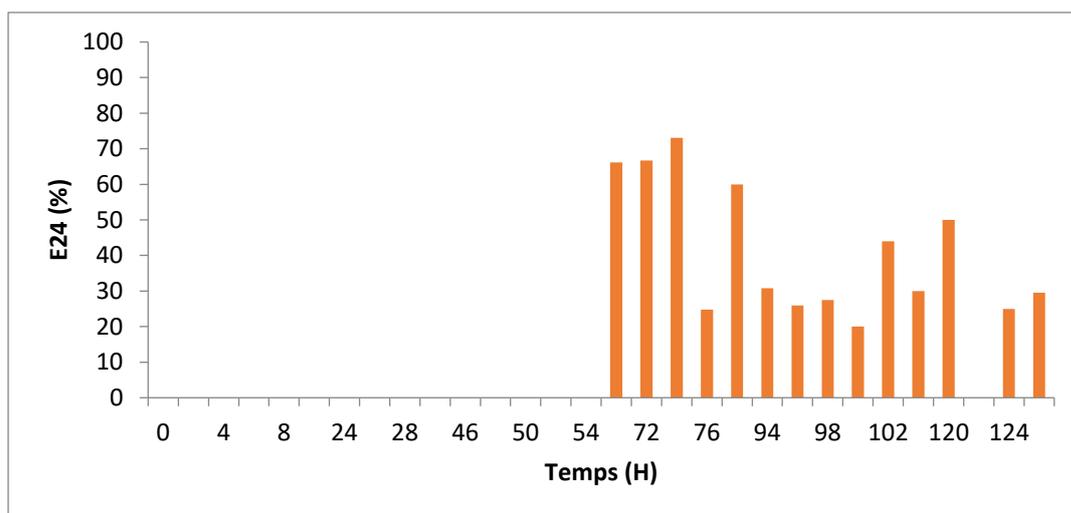


Figure 9: Représentation du taux d'émulsification (E24) des biosurfactants produits par *P.luteola* sur milieu M1.

La tension superficielle est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles. D'après la **figure 10**, nous remarquons que la tension superficielle tend à diminuer de 47,5 Dyne/cm² jusqu'à 38,1 Dyne/cm² après 4 heures de fermentation.

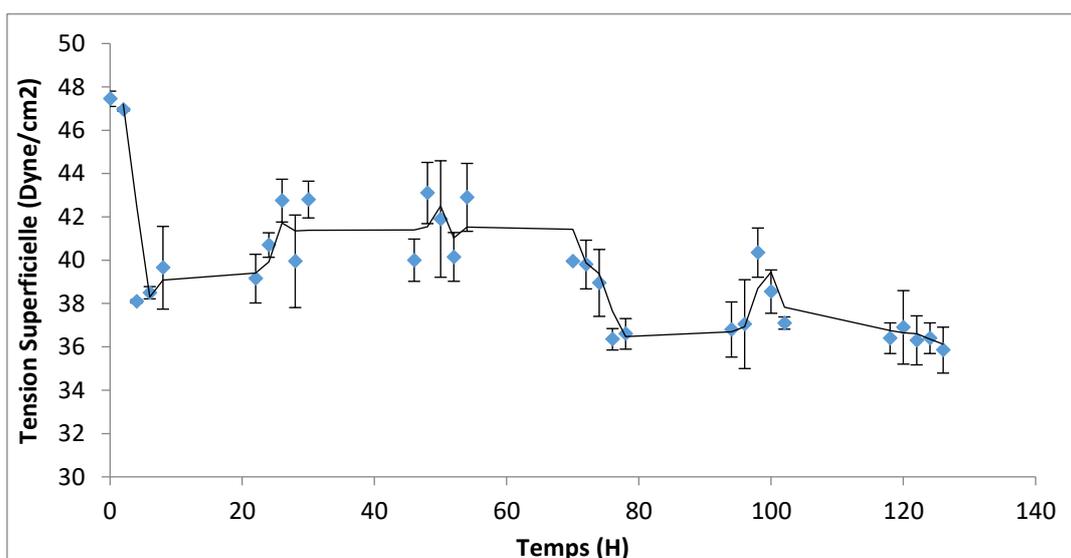


Figure 10: Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur milieu M1.

Nous tenons à signaler que la plus faible valeur de la tension superficielle a été enregistré après 76 heures de culture atteignant une valeur de 36,4 Dyne/cm² et qui reste stable jusqu'à la fin de la fermentation. **Pornsunthorntaweewa et al, (2008)** ont montré que les biosurfactants sont capables de réduire la tension superficielle d'eau jusqu'à 29,0 mN/m. Selon la littérature, les biosurfactants bactériens sont plus efficaces pour réduire la tension superficielle. En particulier, les *Pseudomonas* ont été les plus étudiés pour produire un

biosurfactant puissant, avec la capacité de réduire la tension superficielle à des valeurs proches de 28 à 27 mN / m **(Liu et al, 2018)**.

Nous concluons que la réduction de la tension superficielle s'est remarquée durant la première phase exponentielle et à la fin de la phase stationnaire. Ce résultat nous permet de mettre en évidence la présence des biomolécules ayant des propriétés tensio-actives (biosurfactants).

III.2 Caractérisation du lactosérum :

Les résultats de la caractérisation du lactosérum sont représentés par le tableau 8. Il ressort de ce dernier que la mesure de pH montre que le lactosérum utilisé est un effluent acide (pH=5,2), cette valeur correspond au pH d'un lactosérum acide **(Violleau, 2009)**. L'acidité est justifiée par le fait que le lactosérum est obtenu à partir de la coagulation du lait par acidification provoquée par l'acide lactique ou l'acide chlorhydrique **(Violleau, 2009)**.

D'après les résultats des analyses physico-chimiques, nous remarquons que le lactosérum est un effluent très chargé en matières organique (DCO=122 g d'O₂/l, DBO₅=110 g/l, COT=84 g/l), Ce qui montre le pouvoir polluant du lactosérum mais qui est biodégradable selon le rapport (DCO/DBO₅=1,1).

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 8: Résultats des analyses physico-chimiques du lactosérum.

Paramètres	Valeurs
pH	5,2
DCO	122 249 mg d'O ₂ /l
DBO ₅	110 646 mg/l
DCO/DBO ₅	1,1
COT	84 700 mg/l
MES	3 320mg/l
MS	35 579 mg/l
La conductivité	5,01 mS/cm
Sucre réducteur	98 971 mg/l
Protéines	28 800 mg/l
SO ₄ ⁻	294,9mg/l
NO ₂ ⁻	0,1 µg/l
NO ₃ ⁻	16,8 mg/l
NH ₄ ⁺	651 mg/l
Ca ²⁺	561,4 mg/l
Na ⁺	6 440 mg/l
K ⁺	2385,1 mg/L
Cl ⁻	2 100 mg/l
PO ₄ ³⁻	670,3 mg/l

La présence des différentes formes d'azote assimilable (nitrites, nitrates et ammonium) est certainement due aux protéines et aux vitamines. Ces dernières contiennent des molécules d'azote qui, après leur oxydation se forme les différentes formes oxydées de l'azote selon le degré d'oxydation (**Violleau, 2009**), mais notons une faible concentration en nitrites et nitrates

Toutes les matières minérales du lait se trouvent dans le lactosérum (K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Na⁺) (**Fersadou, 2009**). Le lactosérum contient aussi des teneurs importantes en protéines 28,8 g /let sucres réducteurs 98,9 g/l, ces concentrations élevées sont dues à la présence du lactose, les protéines solubles et les acides aminés.

Ces résultats ne font que confirmer la richesse du lactosérum en éléments nutritifs et aussi expliquer la raison qui pousse plusieurs chercheurs à en faire le centre d'intérêt de plusieurs recherches. En effet, le valoriser en profitant de sa richesse en nutriments, qui fait de lui un excellent milieu de culture, et trouver une solution pour les problèmes environnementaux qu'il induit sont les principaux paramètres qui justifient l'intérêt de la communauté scientifique à ce sujet (Violleau, 2009).

III.1.2 Production de biosurfactant sur un rejet agroalimentaire :

L'objectif assigné dans cette partie est d'utiliser le lactosérum à l'état brut comme milieu de culture pour la production de bio-tensioactif par *P.luteola*.

III.1.2.1 Cinétique de la croissance bactérienne :

Les résultats de la cinétique bactérienne sont représentés sur la figure 11.

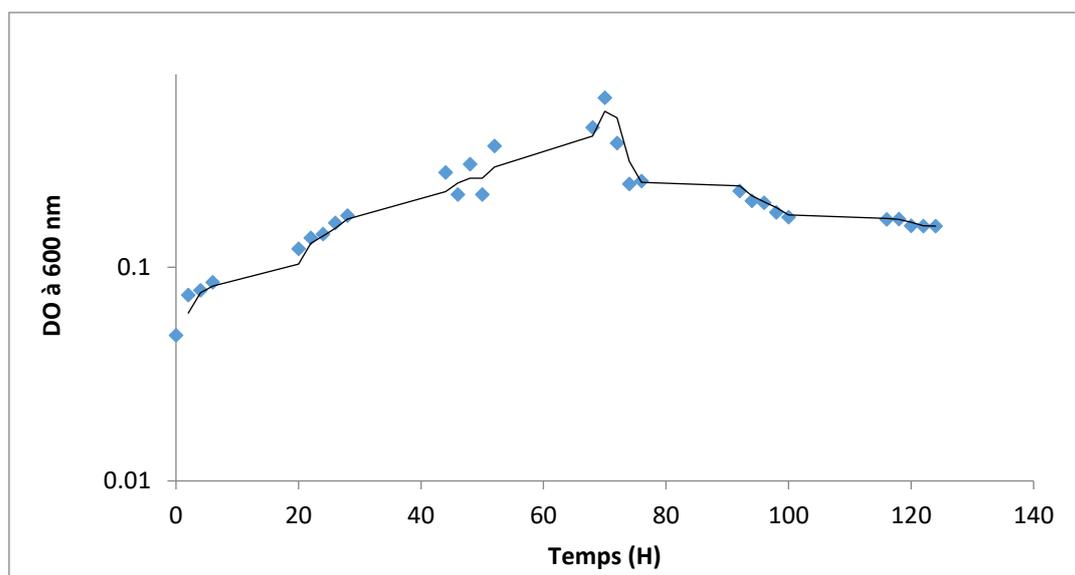


Figure 11: Cinétique de croissance de *P. luteola* sur le lactosérum.

D'après l'allure de la courbe, nous constatons une courbe de croissance exponentielle biphasique. Après une première phase exponentielle, la croissance s'arrête au bout de 20 heures de fermentation et redémarre à nouveau de façon exponentielle. En effet, *Pseudomonas luteola* cultivée sur le lactosérum contenant le glucose et le lactose assimile en premier le glucose par des enzymes constitutives. Après l'épuisement du glucose, la répression de l'opéron est levée et le lactose est métabolisé par des enzymes inductibles d'où l'apparition d'une nouvelle phase de croissance exponentielle. Le phénomène de diauxie se confirme dans notre cas.

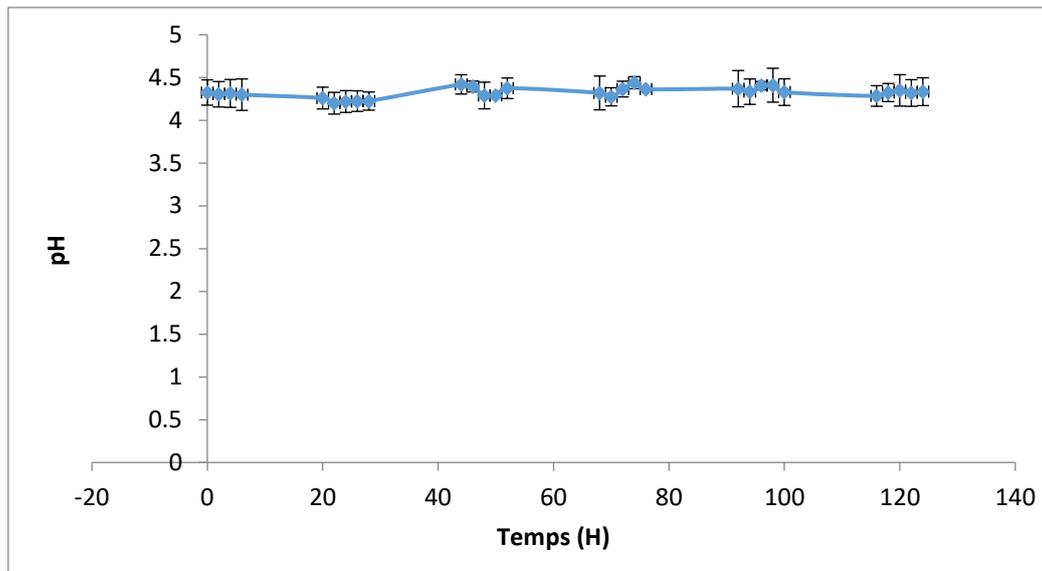


Figure 12: Evolution du pH au cours de la fermentation sur le lactosérum.

La mesure du pH (Figure 12) montre que le pH du milieu est acide et stable tout au long de la fermentation. Pour travailler dans les conditions optimales de production de biosurfactant, il faut ajuster le pH dans l'intervalle de la neutralité entre pH 6 et 8. D'après **Djerbaoui (2011)**, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5 pour *Pseudomonas aeruginosa*.

III.1.2.2 Suivi de la tension superficielle :

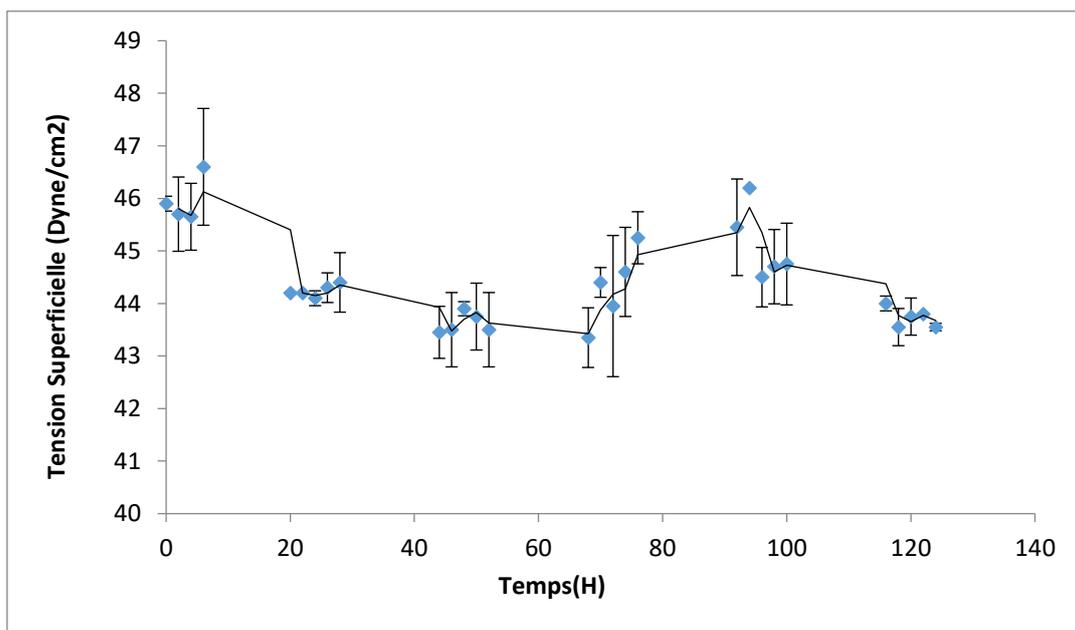


Figure 13: Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur le lactosérum.

Selon la courbe obtenue (**Figure 13**), une diminution de la tension superficielle a été constatée après 68 heures de la fermentation. Une réduction de ce paramètre a été enregistrée de 46,6 à 43,4 Dyne/cm². Cette faible diminution de la tension superficielle observée sur le lactosérum par rapport au milieu semi-synthétique est due à une inhibition de la production du biosurfactant. Cette inhibition est provoquée par un excès de substrat carbonée (COT=84,7 gd'O₂/l, protéines=28,8 g/l, sucres réducteurs=98,97g/l). D'après la bibliographie, pour une croissance optimale, il est nécessaire d'effectuer des dilutions du lactosérum afin d'éviter l'inhibition par excès de substrat (**Rashedi ,2005; Daniel et al ,1998**)

Riera et al (1985), ont démontré qu'une dilution 1/3 de lactosérum donne des meilleures performances pour la production des biosurfactants.

Daniel et al (1998), ont obtenu une production de fortes concentrations de sophorolipides en utilisant lactosérum déprotéinisé.

III.3 Caractérisation du rejet issu de la production de sérum antiscorpionique:

D'après le **tableau9**, la teneur moyenne en matières organiques exprimée en DCO, COT et DBO₅ est respectivement de l'ordre de 9,85 g d'O₂/l, 7,86 g/l et 1,16 g/l. Cette teneur est très élevée par rapport à la norme de rejet (**Jora, 2006**). Le rapport DCO/DBO₅ est de 8,46 ce qui montre le caractère non biodégradable de notre effluent. Ces résultats montrent que notre effluent a une faible teneur en azote ammoniacal et nitrite. Par contre, il est très riche en nitrate et en sulfate, cela est justifié par l'utilisation de sulfate d'ammonium lors de la production (Précipitation du sérum par le sulfate d'ammonium).

La salinité est l'un des caractères de notre effluent et des concentrations élevés en sel avec une conductivité supérieure à celle de l'eau de mer.

Nous remarquons que l'effluent issu de la production de sérum antiscorpionique contient des protéines et sucres réducteurs mais leurs teneurs est très faible par rapport au lactosérum.

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Tableau 9: Résultats des analyses physico-chimiques du rejet issu de la production de sérum antiscorpionique.

Paramètres	Valeurs
pH	6,3
DCO	9 858 mg d'O ₂ /l
DBO ₅	1 165 mg/l
DCO/DBO ₅	8,46
COT	7 864 mg/l
MES	1 219 mg/l
MS	6 753 mg/l
La conductivité	107,7 mS/cm
Sucre réducteur	948 mg/l
Protéines	6 988 mg/l
SO ₄ ²⁻	571 mg/l
NO ₃ ⁻	6 041 mg/l
NO ₂ ⁻	1,74 µg/l
NH ₄ ⁺	23,16 mg/l
Ca ²⁺	320,8 mg/l
Na ⁺	11 040 mg/l
K ⁺	2 502 mg/L
Cl ⁻	2 250 mg/l
PO ₄ ⁻³	30,4 mg/l

III.1.3 Production de biosurfactants sur un rejet pharmaceutique:

L'objectif de cette partie est d'étudier l'efficacité de l'utilisation d'un rejet pharmaceutique (effluent issu de la production de sérum antiscorpionique), pour la production de bio-tensioactif par *P.luteola*. Ainsi, nous avons optimisé la meilleure concentration qui va induire le meilleur taux de production de biosurfactants. Pour ce faire, nous avons réalisé une série de dilution du rejet : 5%, 15%, 30%, 60%, et un essai à l'état brut.

Pour la suite de notre étude, nous n'avons pas pu suivre l'évolution de l'indice d'émulsion E 24 à cause d'une coagulation entre le gasoil et le mout de fermentation. Ce phénomène est présent pour toutes les concentrations des rejets, qui peut être justifié par la concentration élevée en protéine et aussi l'extrême force ionique.

III.1.3.1 Production sur le rejet pharmaceutique à l'état brut:

III.1.3.1.1 Cinétique de la croissance bactérienne :

La croissance bactérienne a été déterminée en suivant la densité optique (DO) à 600 nm. Les résultats sont représentés par **la figure 14**.

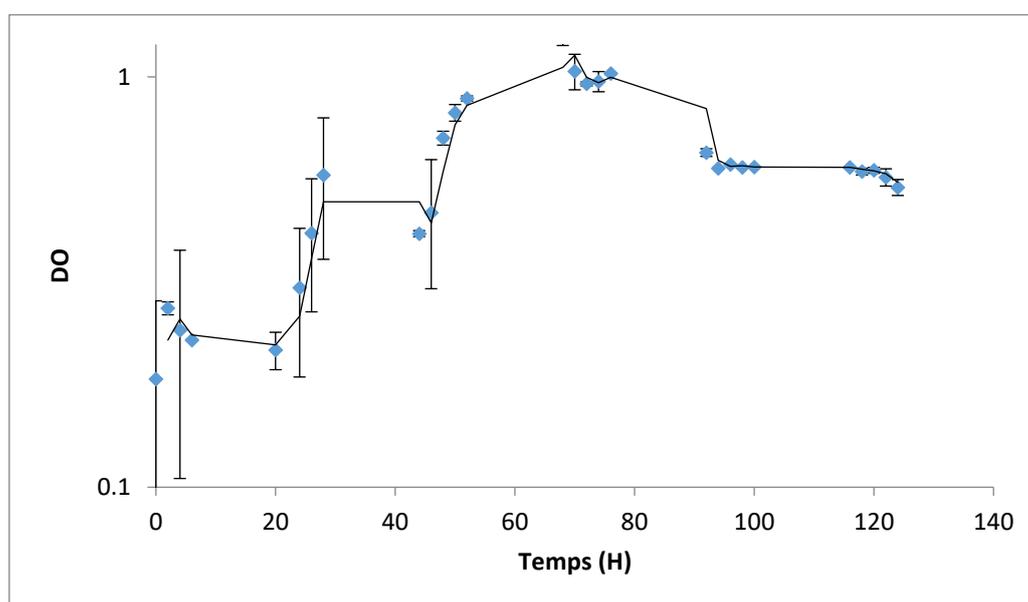


Figure 14: Cinétique de croissance de *P. luteola* sur le rejet pharmaceutique à l'état brut.

L'allure de la courbe de croissance montre une croissance biphasique. Le phénomène de diauxie se confirme par la présence de deux phases exponentielles avec arrêt intermédiaire de la croissance. Nous remarquons aussi que la croissance commence après une longue phase de latence (20h).

Plusieurs chercheurs ont démontré que *P.luteola* est capable de produire des biosurfactants dans une longue gamme de concentration en sel (Tayfun et al, 2013; Soltani, 2004).

Al-Nahas et al (2011); Soltani (2004), ont prouvé que les *Pseudomonas* sont capables de croître et de produire des biosurfactants lorsqu'elles étaient cultivées sur différents substrats et à des salinités élevées.

D'après la **figure 15**, la mesure du pH a montré une très légère augmentation dans le pH du milieu, tout en restant dans la zone de la neutralité.

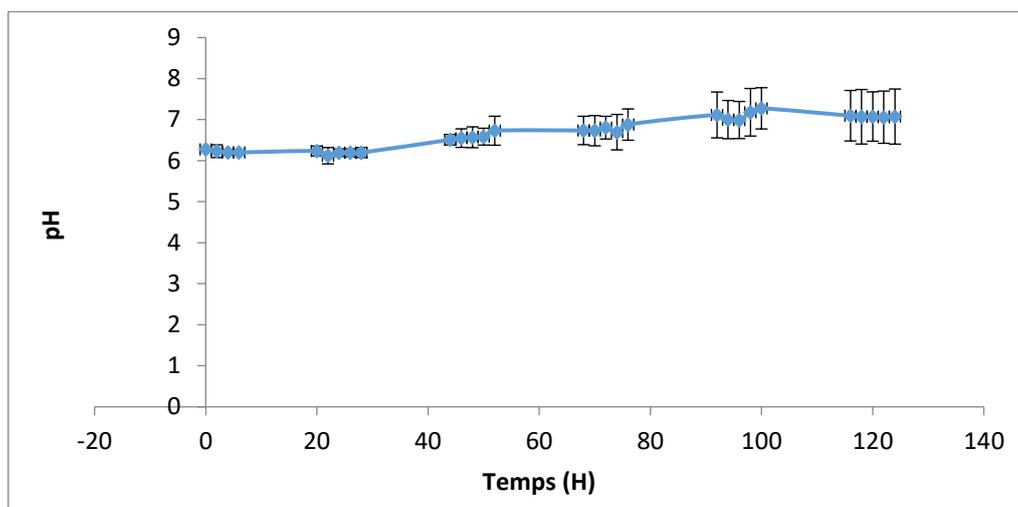


Figure 15: Evolution du pH au cours de la fermentation sur le rejet pharmaceutique à l'état brut.

III.1.3.1.2 Suivi de la tension superficielle :

D'après la courbe de la **figure 16**, nous constatons que la valeur de la tension superficielle diminue en fonction du temps jusqu'à une valeur minimale égale à 37,9 Dyne/cm² après 52 heures de fermentation, ce qui correspond à la seconde phase stationnaire.

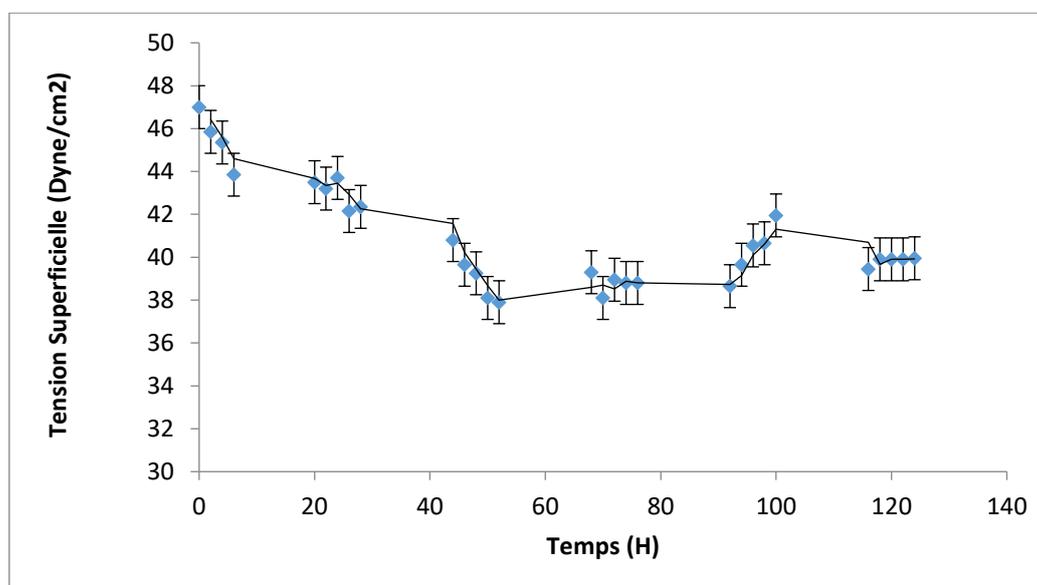


Figure 16: Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur le rejet pharmaceutique à l'état brut.

III.1.3.2 Production des biosurfactants sur un milieu contenant 60% de rejet pharmaceutique :

III.1.3.2.1 Cinétique de la croissance bactérienne :

D'après la **figure17**, on remarque que la courbe obtenue présente des similitudes avec celle obtenue sur le rejet à l'état brut. La cinétique révèle une courbe biphasique due à la composition complexe du rejet ce qui a entraîné l'apparition du phénomène de diauxie. Le suivi du pH au cours de la fermentation montre que le pH est constant tout au long de la fermentation (**figure 18**). Cette stabilité peut être expliquée par l'effet tampon du rejet.

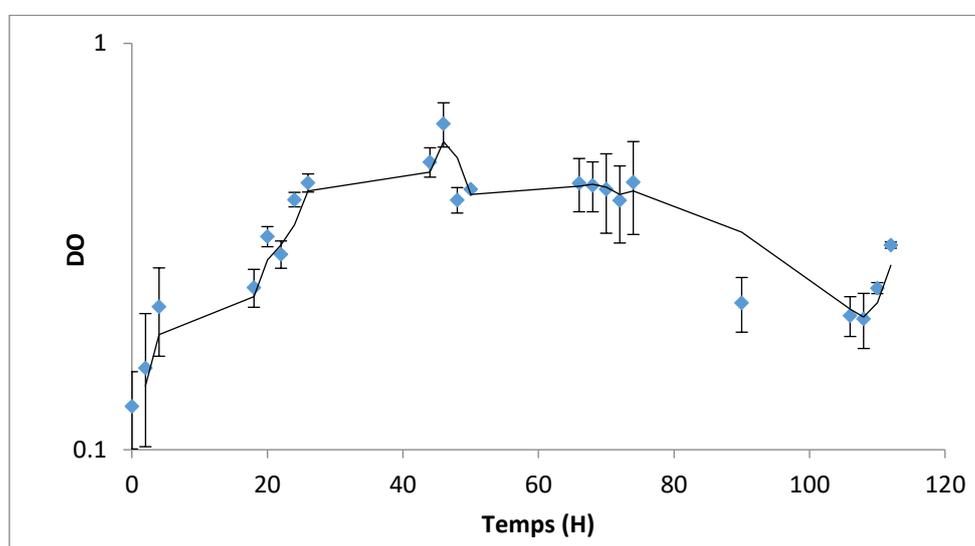


Figure 17: Cinétique de croissance de *P.luteola* sur un milieu contenant 60% de rejet pharmaceutique.

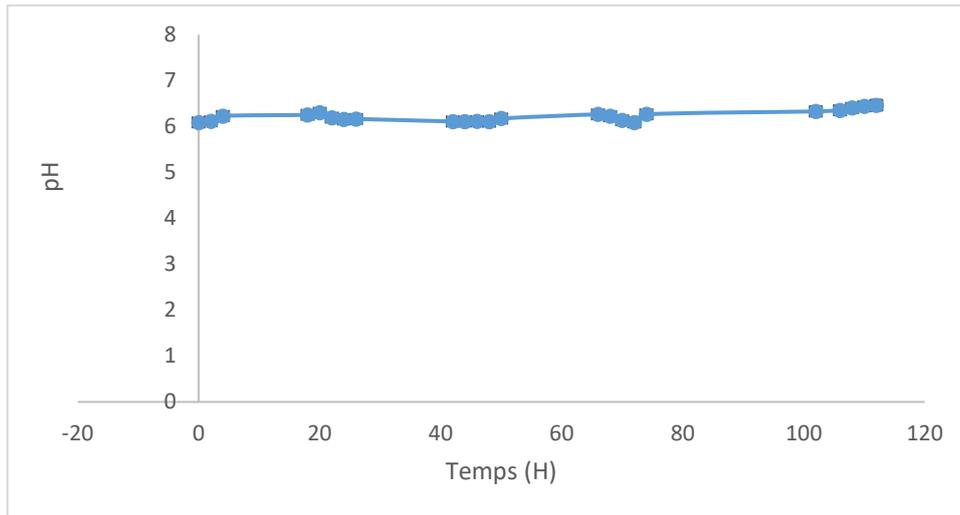


Figure 18: Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu contenant 60% du rejet.

III.1.3.2.2 Suivi de la tension superficielle :

D'après le graphe de la tension superficielle en fonction du temps (**figure19**), nous observons une diminution de la tension superficielle au bout de 2 heures, ceci correspond à la première phase exponentielle de la croissance. Sachant qu'une valeur minimale de 36,5 Dyne/cm² a été enregistrée et qui demeure presque constante durant toute la fermentation.

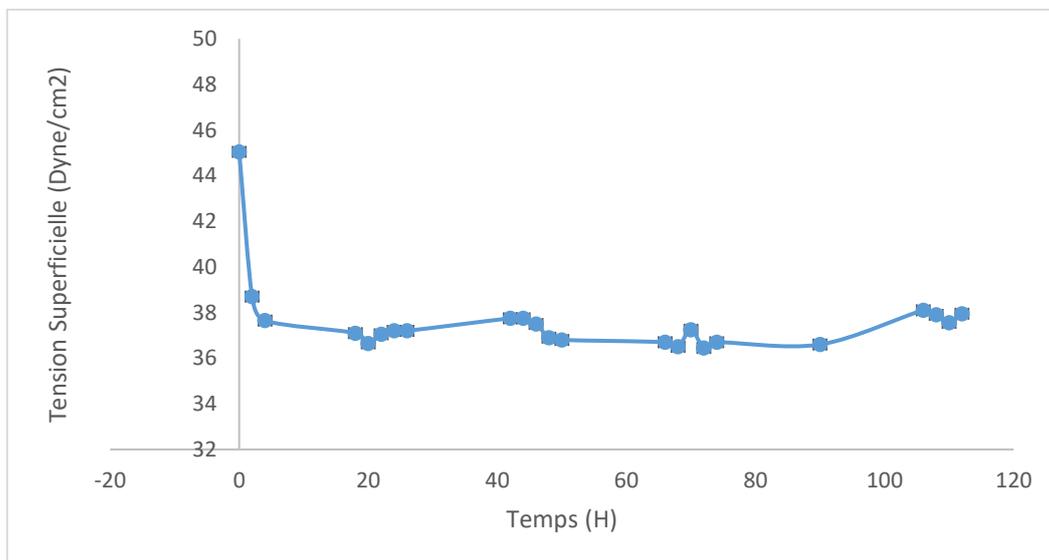


Figure 19: Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur un milieu contenant 60% de rejet.

III.1.3.3 Production des biosurfactants sur un milieu contenant 30% de rejet pharmaceutique :

III.1.3.3.1 Cinétique de la croissance bactérienne :

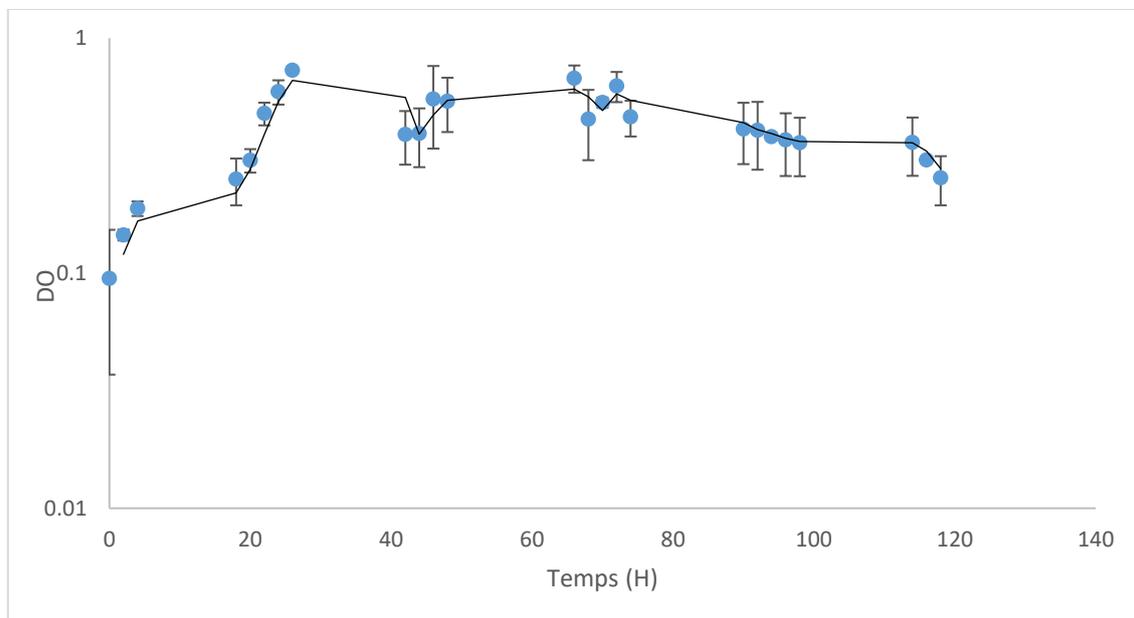


Figure 20: Cinétique de croissance de *P. luteola* sur milieu contenant 30% de rejet pharmaceutique.

D'après l'allure de la courbe de croissance, nous observons la présence de deux phases de croissance exponentielle. Une longue phase exponentielle a été notée par rapport aux précédentes fermentations (**figure 20**). Cette croissance est accompagnée par une légère augmentation du pH pendant la fermentation (**figure 21**).

Deepika et al, (2017) ont prouvé que la limitation des concentrations d'azote entraîne une production maximale de biosurfactant.

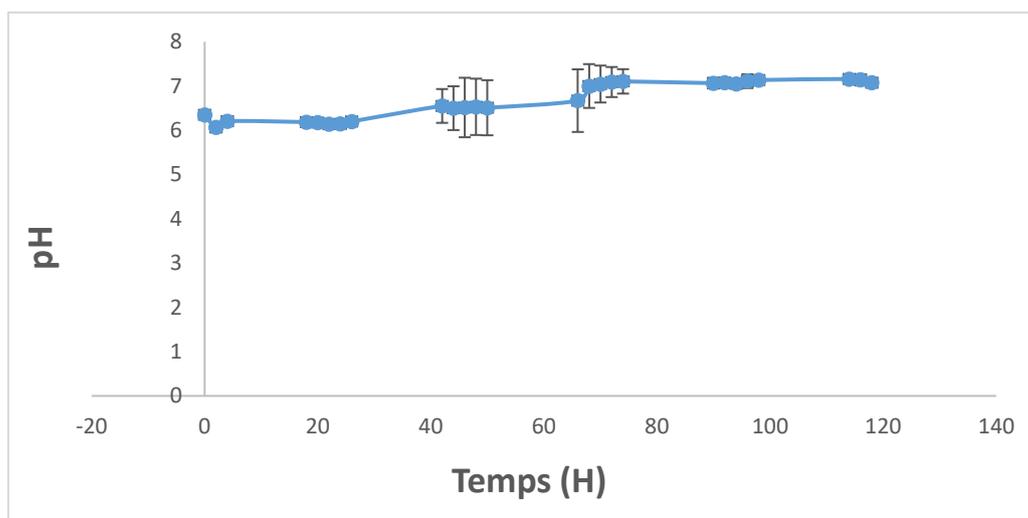


Figure 21: Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu contenant 30% de rejet pharmaceutique.

III.1.3.3.2 Suivi de la tension superficielle :

D'après les résultats obtenus de la mesure de la tension superficielle en fonction du temps (**Figure 22**), nous observons une réduction de la tension superficielle jusqu'à une valeur égale à 35,1 Dyne/cm² après 24 heures de culture, avec un taux de réduction de 20,4% de la tension superficielle. Cette faible tension superficielle est notée à la fin de la phase exponentielle.

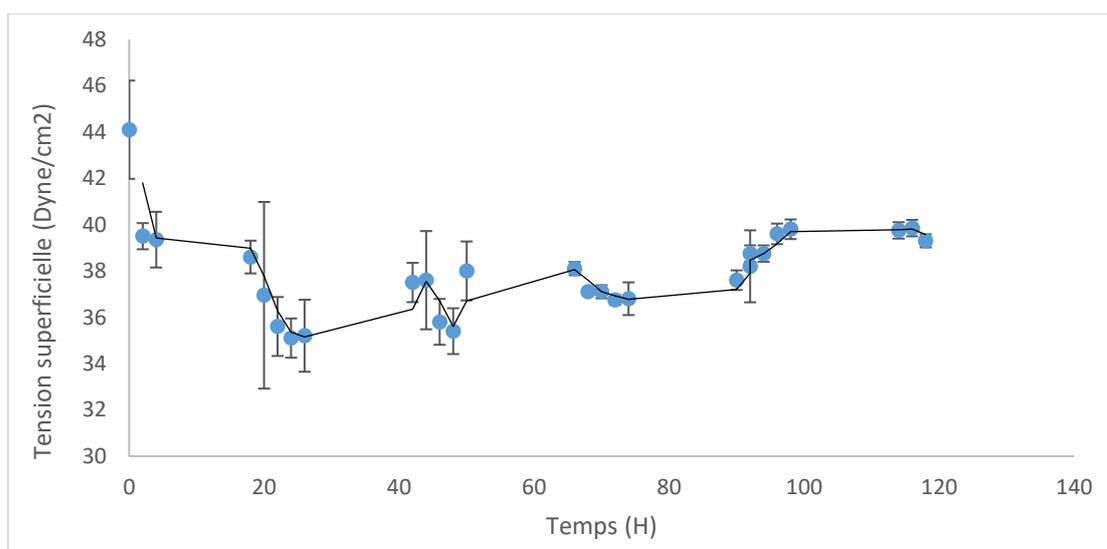


Figure 22: Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur milieu contenant 30% de rejet pharmaceutique.

III.1.3.4 Production des biosurfactants sur un rejet contenant 15% du rejet pharmaceutique :

III.1.3.4.1 Cinétique de la croissance bactérienne :

D'après l'allure de la courbe de croissance, le phénomène de diauxie s'appuie à nouveau avec 15% du rejet pharmaceutique, Ceci serait probablement dû à la composition en sucres réducteurs du rejet. La seconde phase exponentielle est suivie directement par une phase de ralentissement où la vitesse de croissance régresse (**Figure 23**). Pour le pH, le même constat que la fermentation à 30% du rejet, une légère hausse du pH a été remarquée (**Figure 24**).

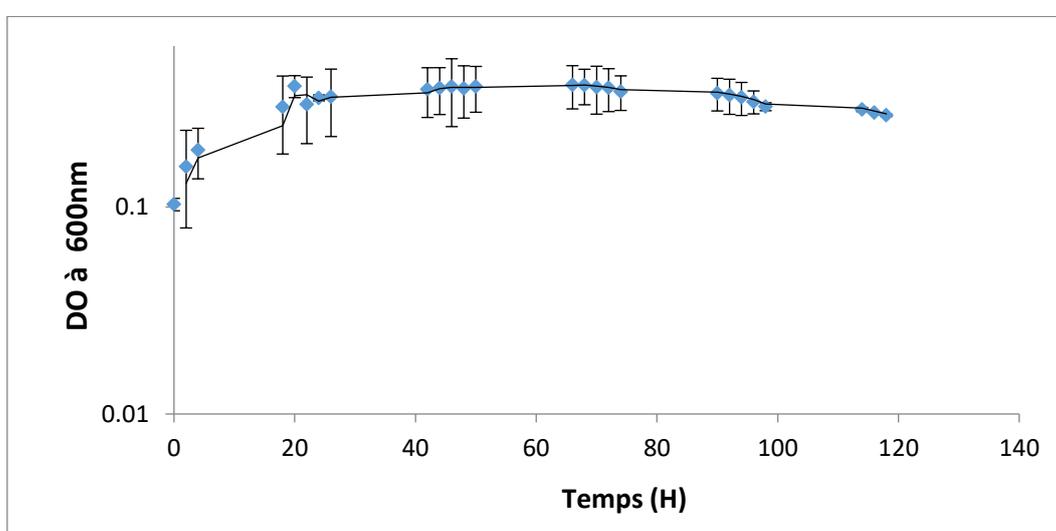


Figure 23: Cinétique de croissance de *P. luteola* sur milieu contenant 15% de rejet pharmaceutique.

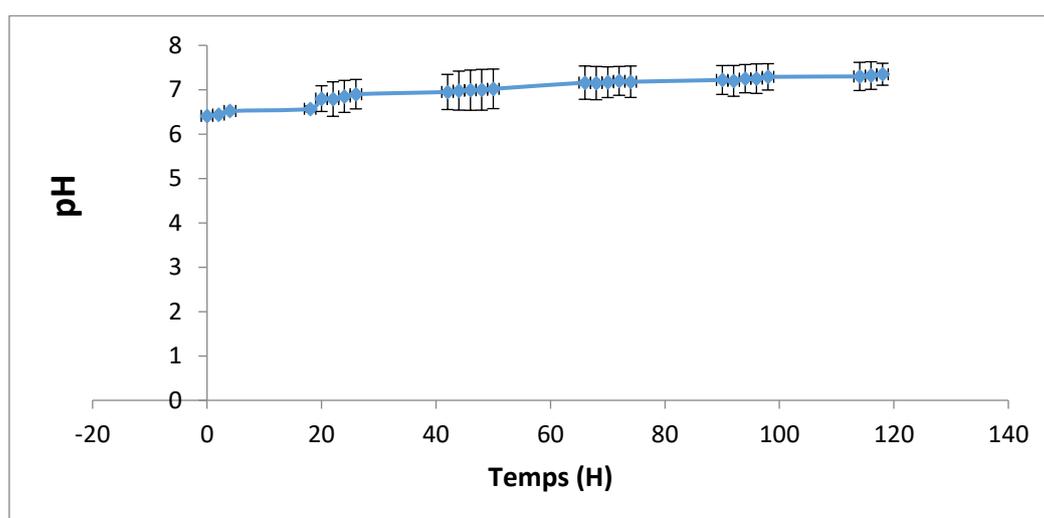


Figure 24: Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu contenant 15% du rejet pharmaceutique.

III.1.3.4.2 Suivi de la tension superficielle :

D'après la variation de la tension superficielle (**Figure 25**), nous remarquons des fluctuations pour les valeurs mesurées mais nous observons une diminution après 24 heures suivie d'une augmentation. Cette diminution est due à la présence des biomolécules tensio-actives.

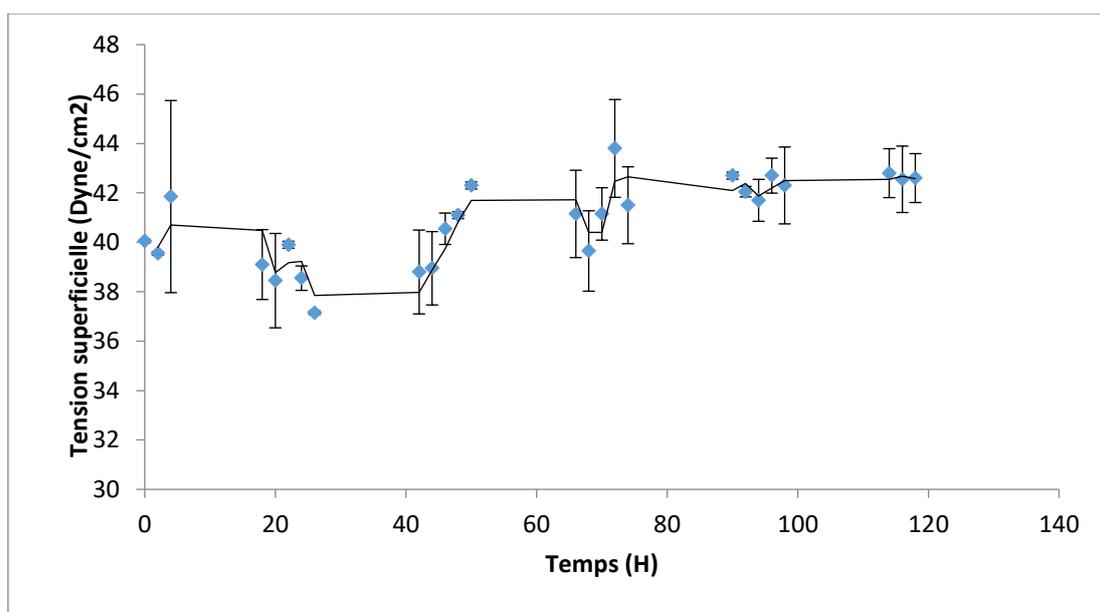


Figure 25: Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur milieu contenant 15% de rejet.

III.1.3.5 Production des biosurfactants sur un milieu contenant 5% du rejet pharmaceutique :

III.1.3.5.1 Cinétique de la croissance bactérienne :

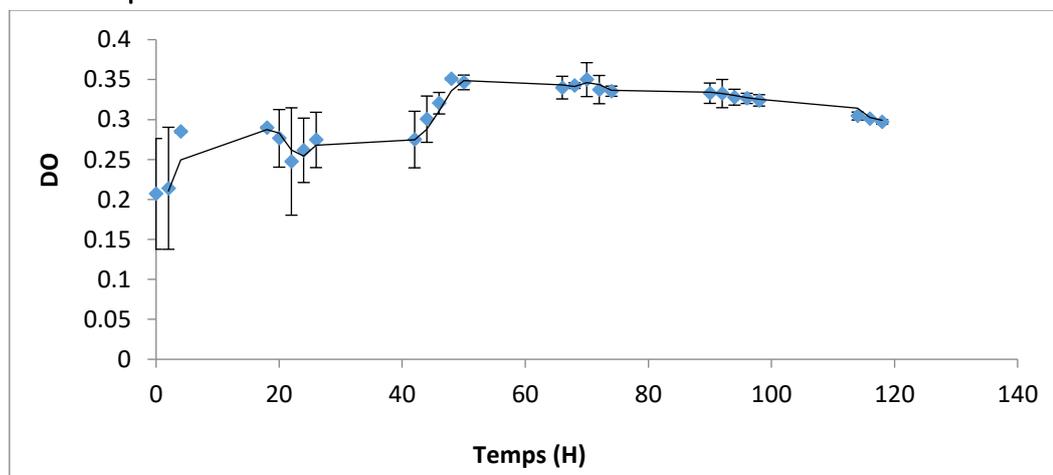


Figure 26: Cinétique de croissance de *P. luteola* sur milieu contenant 5% de rejet pharmaceutique.

Dans cet essai, nous constatons que la croissance de *P.luteola* est moins performante que les fermentations antécédentes (**Figure 26**). Ceci prouve qu'une carence en éléments nutritifs suite à une forte dilution du rejet est préjudiciable pour la croissance. La mesure du pH révèle, une légère augmentation au cours de la fermentation (**Figure 27**).

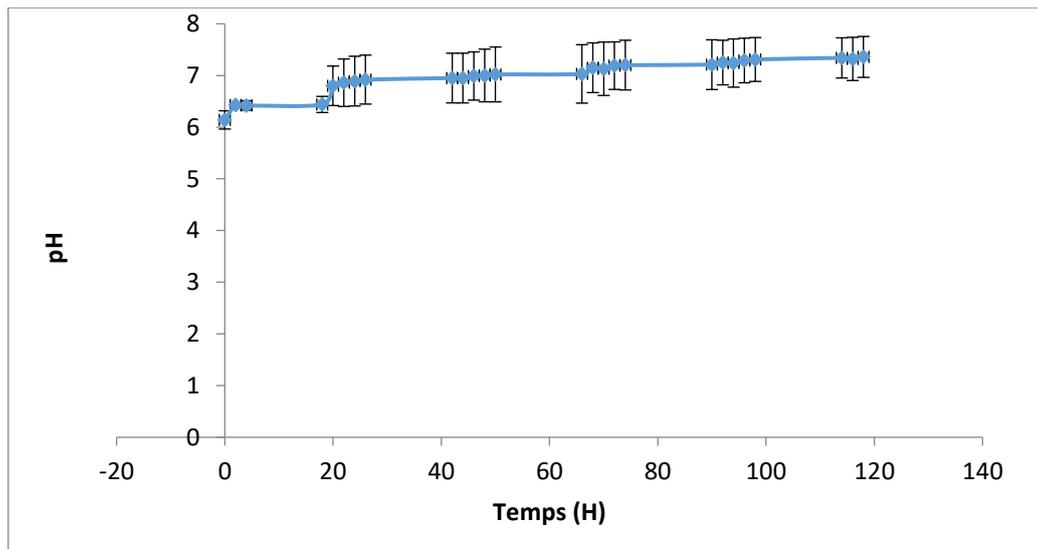


Figure 27: Evolution du pH au cours de la fermentation sur milieu contenant 5% du rejet.

III.1.3.5.2 Suivi de la tension superficielle :

Tout comme la croissance, une inhibition de la production de biosurfactants a été constatée. Cette inhibition se traduit par une augmentation de la tension superficielle tout au long de la fermentation (**Figure 28**).

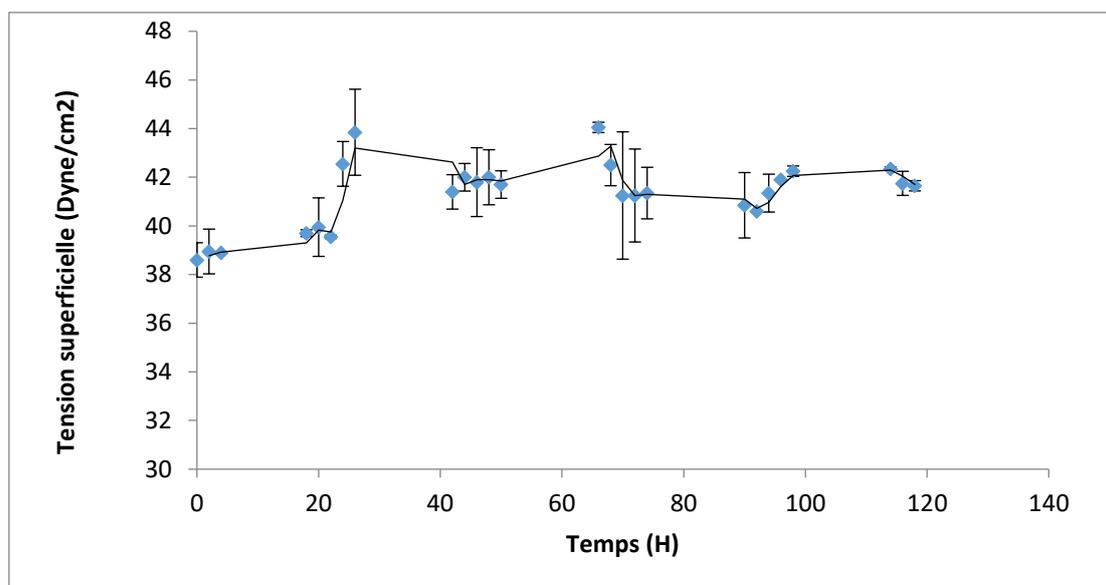


Figure 28: Evolution de la tension superficielle au cours de la fermentation sur un milieu contenant 5% du rejet pharmaceutique.

III.4 Comparaison de la tension superficielle sur les différents milieux de culture :

Le tableau 10 récapitule les résultats obtenus lors de notre étude.

Tableau 10: influence de la composition des milieux de culture sur la tension superficielle.

Milieu de culture	Tension superficielle initiale(Dyne/cm ²)	Tension superficielle minimale(Dyne/cm ²)	Taux de réduction de la tension superficielle
M1 (semi-synthétique)	47,5	35,9	24,4%
Lactosérum (100%)	46,6	43,4	7,0%
Antiscorpionique(100%)	47	37,9	19,4%
Antiscorpionique (60%)	45,1	36,5	19,2%
Antiscorpionique (30%)	44,2	35,1	20,5%
Antiscorpionique (15%)	40,1	37,2	7,4%
Antiscorpionique (5%)	38,1	38,1	0

Chapitre 3 : Résultats et discussion

Il ressort de ce tableau que le meilleur résultat en terme de diminution de la tension superficielle est la production sur un milieu contenant 30% du rejet pharmaceutique. La souche bactérienne *Pseudomonas luteola* est capable de produire des biosurfactants sur différents milieux de culture à savoir : un milieu semi synthétique à base de glucose, le lactosérum et le rejet issu de l'industriel pharmaceutique.

L'utilisation du rejet issu de la production du sérum anti-scorpionique comme substrat pour la production de biosurfactant est très efficace. Cependant, la concentration du rejet joue un rôle très important dans l'efficacité de la production du biosurfactant ainsi sur la stabilité de la production.

Conclusion générale

Le travail présenté dans ce mémoire concerne la production de biosurfactants par une souche de *Pseudomona luteola* sur des substrats à faible coût ; à savoir : le lactosérum et l'effluent issu de la production du sérum antiscorpionique.

Dans une première étape de l'étude, une caractérisation physico-chimique des rejets a été réalisée, les résultats obtenus ont montré que les rejets sont fortement pollués révélant une DCO très élevée.

Dans une deuxième étape, nous avons étudié l'efficacité de la production de biosurfactants sur les deux rejets à l'état brut. L'utilisation du rejet issu de la production de sérum antiscorpionique nous a permis de réduire la tension superficielle de 19,4% contre 7,0% du lactosérum. Et ainsi donc, on a pu démontrer la capacité de la souche à croître sur le rejet pharmaceutique et de produire les biosurfactants.

Par la suite, nous avons procédé à une optimisation du rejet pharmaceutique qui entrainera la meilleure production en biosurfactant. Les résultats obtenus lors de cette optimisation et le suivi de la tension superficielle montrent que la plus basse valeur de la tension superficielle est de 35,1 Dyn/cm² qui est atteinte sur le milieu contenant 30% de rejet pharmaceutique avec un taux d'abaissement de 20,5%. Toute fois il y a lieu de signaler que le meilleur taux de réduction 24,4% est obtenu sur un milieu semi-synthétique M1 où la tension superficielle diminue jusqu'à atteindre une valeur de 35,9 Dyne/cm².

En perspective, il est proposé de compléter ce travail par une étude plus approfondie à savoir :

- Identification des biosurfactants produits.
- Développement d'une méthode plus appropriée pour la révélation de la présence de biomolécules tensio-actives dans le milieu.

Références Bibliographiques

« A »

1. Alami E, Holmberg K (2001) Heterogemini surfactants based on fatty acid synthesis and interfacial properties. *J Colloid Interface Sci* 239:230–240
2. Aimmair A, Sobhon V, Maneerat S (2011) Molasses as a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. *Appl Biochem Biotechnol* 165(1):315–335
3. Amir-Heidari B, Thirlway J, Micklefield J (2008) Auxotrophic-precursor directed biosynthesis of nonribosomal lipopeptides with modified tryptophan residues. *Org Biomol Chem* 6:975–978
4. Abalos A, Pinazo A, Infante MR, Casals M, García F, Manresa A (2001) Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17:1367–1371
5. Audic, J.L., Chaufer, B et Daufin, (2003) Non-food applications of milk components and dairy co-products. A review : INRA, EDP Sciences, 417-438.
6. Anivasagan P, Sivasankar P, Venkatesan J et al (2014) Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine Actinobacterium , *Streptomyces* sp. MAB36. *Bioprocess Biosyst Eng* 37(5):783–797

« B »

7. Bensedallah Leila (2017). Thèse de Doctorat en Génie de l'Environnement Option : Biotechnologie : Valorisation d'un rejet riche en sels et en protéines par deux techniques membranaires.
8. Banat I, Makkar S. (2002). Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants.
9. Beeba JL, Umbriet WW. (1971). Extracellular lipids of *Thiobacillus thiooxidans*. *J Bacteriol*;108(1):612-615.
10. Ban T, Sato T, Yen TF. (1998). Interfacial activity of n-alkylamines from microbially produced spiculisporic acid. *J of Petrol Sci Eng*;21:223-238.
11. Bury, S. J. et C. A. Miller. (1993). Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. *Environ. Sei. Technol.* 27:104-110.

« C »

12. Chen SY, Wei YH, Chang JS. (2007). Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. *Appl Microbiol Biotechnol*;76(1):67-74.
13. Cirigliano M. C. and Carman G. M. (1985). Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Appl Environ Microbiol.* Oct; 50(4): 846– 850.

« D »

14. Deepika, Ganji Purnachandra Nagaraju , and Bramhachari, (2017). Optimization of Cultural Conditions for Marine Microbial Biosurfactant Production: Future Prospects from Untapped Marine Resources.
15. Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Rev* 61: 47-64
16. Das P, Mukherjee S, Sen R (2009b) Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium. *Bioresour Technol* 100(2):1015–1019

« E »

17. Erum shoeb, faiza akhlaq, uzma badar, jameela akhter, samina imtiaz, (2013). Classification and industrial applications of Biosurfactants

« F »

18. Franzettia A., Careddaa P., Ruggerib C., La Collab P., Tamburinib E., Papacchinic M., Bestettia G. (2009). Potential applications of surface active compounds by *Gordonia* sp. strain BS29 in soil remediation technologies. *Chemosphere* 75 (6), 801-807.
19. Fiechter, A. 1992. Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends Biotechnol.* 10:208-217.

« G »

20. Gerson OF, Zajic JE. Surfactant production from hydrocarbons by *Corynebacterium lepus*, sp. nov. and *Pseudomonas asphaltenicus*, sp. nov. *Dev. Ind. Microbiol.* 1978;19:577–599.
21. Georgiou G, Lin SC, Sharma M (1992) Surface active compounds from microorganisms. *Biotechnology* 10: 60-65
22. GELEGENIS J. V Optimization of biogas production by co-digesting whey with diluted
23. poultry manure. *RenewableEnergy* [en ligne], 2007.vol 32 N°13.[consulté 5/2016].P 2147-2160.

« H »

24. Huang XF, Liu J, Lu LJ, Wen Y, Xu JC, Yang DH, et al. (2009). Evaluation of screening methods for demulsifying bacteria and characterization of lipopeptide bio-deemulsifier produced by *Alcaligenes* sp. *Bioresour Technol*;100:1358-1365
25. Hirata Y., Ryua M., Odaa Y., Igarashia K., Nagatsukaa A., Furutaa T., Sugiuraa M (2009). Novel characteristics of sophorolipids, yeast glycolipid biosurfactants, as biodegradable low-foaming surfactants. *J. Biosci. Bioeng.* 108 (2), 142-146.

26. Holmberg CI, Hietakangas V, Mikhailov A, Rantanen JO, Kallio M, Meinander A, Hellman J, Morrice N, MacKintosh C, Morimoto RI, Eriksson JE, Sistonen L. (2001). Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1.

« I »

27. Ishigami, Y., Y. Gama, H. Nagahora, M. Yamaguchi, H. Nakahara, et T. Kamata. (1987). The pHsensitive conversion of molecular aggregates of rhamnolipid biosurfactant. Chem. Lett. 763-766.

« J »

28. Joshi S, Bharucha C, Desai AJ (2008) Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresour Technol* 99:4603–4608
29. Jennema GE, McInerney MJ, Knapp RM, Clark JB, Feero JM, Revus DE, Menzie DE. (1983). A halotolerant, biosurfactants-producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery. *Dev. Ind. Microbiol.* 24:485–492

« K »

30. Kitamoto D., Morita T., Fukuoka T., Konishi M-A., Imura T. (2009). Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. *Curr. Op. Colloid Interface Sci.* 14 (5), 315-328,
31. Kedidi Amel ; (2014). Effets de salinité sur la stabilité des biosurfactants produits par des souches bactériennes telluriques en présence du gasoil.
32. Kim HS, Jeon JW, Kim BH et al (2006) Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:391–396
33. Kiran GS, Anto Thomas T, Selvin J et al (2010b) Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state culture. *Bioresour Technol* 101:2389–2396
34. Klosowska-Chomiczewska I, Medrzycka K, Karpenko E (2011) Biosurfactants–biodegradability, toxicity, efficiency in comparison with synthetic surfactants. In: Plaza E, Levlin E (eds) *Proceedings of the polish-Swedish-Ukrainian seminar “Research and application of new technologies in wastewater treatment and municipal solid waste disposal in Ukraine, Sweden and Poland”*
35. Kaeppli O, Finnerty WR. (1979) Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecanegrown *Acinetobacter*. *J Bacteriol*;140(2):707-712

36. Kappeli O, Walther P, Mueller M, Fiechter A. (1984). Structure of cell surface of the yeast *Candida tropicalis* and its relation to hydrocarbon transport. *Arch Microbiol*;138:279-282
37. Kakinuma A, Oachida A, Shina T, Sugino H, Isano M, Tanura G, et al. (1969). Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. *Agric Biol Chem*;33:1669-1672.
38. Khemili Souad, (2008). Thèse de Magister : Identification de deux archaebactéries halophiles strictes isolées à partir des eaux de gisement de quelques champs pétroliers du sud Algérien et contribution à la caractérisation des biomolécules produites.

« L »

39. Lee SC, Lee SJ, Kim SH, Park IH, Lee YS, Chung SY, et al. (2008). Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil. *Bioresour Technol*;99:2288-2292.
40. Laieb Roumaissa (2018). Projet fin d'étude : Etude de la production de biosurfactants par une souche de *Pseudomonas aeruginosa* dans un bioréacteur.
41. Liu G, Zhong H, Yang X, Liu Y, Shao B, Liu Z *Biotechnol Bioeng.* (2018) Apr; 115(4):796-814.

« M »

42. Makkar R.S. et Cameotra S.S. ; (2001). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications.
43. Mercade M. E., Manresa M. A., (1994) - The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 71(1), pp. 61-64
44. Mulligan CN, Gibbs BF (1989) Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* . *Appl Environ Microbiol* 55(11):3016–301
45. Mukherjee S. (2006). Mutational analysis of the intramembranous H10 loop of yeast *Nhx1* reveals a critical role in ion homeostasis and vesicle trafficking. *Biochem J* 398(1):97-105
46. Mukherjee S ; Dss S (2009). Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose.
47. Mata-Sandoval JC, Karns J, Torrents A (2001) Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *P. aeruginosa* UG2. *Microbiol Res* 155(4):249–256
48. Moriello VS, Lama L, Poli A et al (2003) Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in fl egrean areas. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30(2):95–101
49. Maier RM, Soberón-Chávez G. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*;54:625–633.

50. Magdalena Pacwa-Płociniczak, Grażyna A. Płaza, Zofia Piotrowska-Seget, and Swaranjit Singh Cameotra. (2001). Environmental Applications of Biosurfactants: Recent Advances.

« N »

51. Nieves ML, Commendatore MG, Estevas JL, Bucalá V. (2008). Biodegradation pattern of hydrocarbons from a fuel oil-type complex residue by an emulsifier-producing microbial consortium. *J. Hazard. Mater.*;154:96–104.

« O »

52. ONTIVEROS J. (2014). Classification des tensioactifs et huiles biocompatibles par mesure de la température d'inversion de phase (PIT) et comparaison des diagrammes de phases. Thèse doctorat : sciences de la matière-du rayonnement et de l'environnement. L'université des sciences et technologies de Lille.. p232.
53. Oukkache, (2008). Une nouvelle approche pour caractériser le venin de scorpion noir « *Androctonus mauretanicus* ». Thèse de Doctorat, Université Hassan II, Casablanca,.
54. Oberbremer, A., R. Müller-Hurtig, et F. Wagner. (1990). Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32:485-489.

« P »

55. Pesce L. (2002). A biotechnological method for the regeneration of hydrocarbons from dregs and muds, on the base of biosurfactants. 02/062,495. World Patent.
56. Parra, Amy Marcini, Joshua Akey. (1989). Estimating African American Admixture Proportions by Use of Population Specific Alleles
57. Pornsunthorntaweeta O, Wongpanita P, Chavadeja S, Abeb M, Rujiravanit R. (2008). Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresour. Technol.*, 99: 1589–1595

« R »

58. Rahman PK, Gakpe E. Production, characterization and applications of biosurfactants-review. *Biotechnol* 2008;7(2):360-370
59. Rehn HJ, Reiff I. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. *Adv Biochem Eng* 1981;19:175-216
60. Raza ZA, Rehman A, Khan MS, Khalid ZM. Improved production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant using vegetable oil refinery wastes. *Biodegradation* 2007;18(1):115-121.

61. RODRIGUES LR, BANAT IM, TEIXEIRA JA and OLIVEIRA R. (2006). Biosurfactants : Applications potentielles en médecine. Journal of antimicrobial chemotherapy. Vol 57. pp 609-618
62. Rosenberg E, Rubinovitz C, Legmann R, Ron EZ. (1988). Purification and chemical properties of *Acinetobacter calcoaceticus* A2 Biodispersan. Appl. Environ. Microbiol;54:323–326.
63. Rouse, J. D., o. A. Sabatini, J. M. Suflita, et J. H. Harwell. (1994). Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. Crit. Rev. Environ. Sei. Technol. 24:325-370.

« S »

64. shingh SP, Bharali P, Konwar BK (2013) Optimization of nutrient requirements and culture conditions for the production of rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 7815) using *Mesua ferrea* seed oil. Indian J Microbiol 53(4):467–476
65. Sifour M, Al-Jilawi MH, Aziz GM. (2007). Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. Pak. J. Biol. Sci; 10:1331–1335.
66. SAMADI N., ABADIAN N., AKHAVAN A., FAZELI M. R., TAHZIBI A., JAMALIFAR H.(2007). Biosurfactant Production By The Strain Isolated From Contaminated Soil, J. Biol. Sci. Vol. 7, No. 7, p. 1266-1269.

« T »

67. Thaniyavarn J, Chongchin A, Wanitsuksombut N et al (2006) Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. J Gen Appl Microbiol 52:215–222

« V »

68. Vasileva-Tonkova E., Gesheva V. (2005): Glycolipids produced by Antarctic *Nocardioides* sp. during growth on n-paraffin. Process Biochem. 40 (7), 2387-2391,.
69. Van Dyke, M. 1., H. Lee, et J. T. Trevors. 1991. Applications of microbial surfactants. Biotech. Adv. 9:241-252.
70. Voileau S. (2009). Valorisation du lactosérum par électrodialyse. Thèse de doctorat. Montpellier.
71. Veenanadig NK, Gowthaman MK, Karanth NGK. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. Bioproc Biosyst Eng ;22(2):95-99.
72. Volkering, F., A. M. Breure, J. G. Van Andel, et W. H. Rulkens. (1995). Influence of nonionic surfactants on bioavailability and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appt. Environ. Microbiol. 61:1699-1705.

« W »

73. Whang LM, Liu PWG, Ma CC, Cheng SS. (2008). Application of biosurfactant, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. J. Hazard. Mater;151:155–163.

74. Wei YH, Wang LF, Chang JS (2004) Optimizing iron supplement for enhanced surfactin production from *Bacillus subtilis* . *Biotechnol Prog* 20:979–983
75. West, C.C., Harwell, J.H., (1992) surfactant and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol* 26, 2324-2330

« Z »

76. Zinjarde SS, Pant A (2002) Emulsifier from a tropical marine yeast, *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. *J Basic Microbiol* 42(1):67–73
77. Zouaoui Malika (2017). Projet fin d'étude : essai production de biosurfactant.
78. Zajic, J. E. et W. Seffens.(1984). Biosurfactants. *CRC Crit. Rev. Blotechnol.*