République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement et de la Recherche Scientifique

Université DR.YAHIA FARES de MEDEA

Faculté des Sciences et de la Technologie
Département du Génie des Procédés



PROJET DE FIN D'ETUDE

Pour l'obtention de diplôme de master en génie des procédés

OPTION: génie des procédés pharmaceutique

THEME :

Production et caractérisation d'un biosurfactant à partir de Bacillus licheniformis par cellules libres et immobilisées

Présenté par

Atsamnia Soumia

Nawel Blaifi.

dirigé par :

Promaotrice Dr : FERHAT samira

Co-promotrice : REHEM fatma zohra

2013/2014

Remerciements

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de certaines personnes à qui on voudrait témoigner toute notre reconnaissance.

On voudrait tout d'abord adresser toute notre gratitude à la directrice de ce mémoire Madame Farhat Samira. Nous avons eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et avons trouvé auprès de vous le conseiller et le guide qui nous a reçus en toute circonstance avec sympathie, sourire et bienveillance.

Nos remerciements vont également à notre Co-promotrice Madame Rahem Fatima Zahra pour la gentillesse la patience, et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail.

Nous tenons à remercier Dr zouambia y Maître de Conférences à l'université de Médéa pour avoir accepté de présider nos jurys de mémoire.

Nous remercions également Mme karmete said ,H et Dr laidi M , Maitres assistants à l'université de Médéa pour avoir accepté de juger ce modeste travail

Nous adressons un remerciement tout particulier à Dr kerrache S pour leurs confiances et disponibilités, ses recommandations et ses conseils précieux et pertinents, qui n'ont pas cessés de me prodiguer le long de notre cursus universitaires

Merci aussi aux responsables des laboratoires du hall technologique du centre universitaire de Médéa, sous la direction de Mr R. Alouaoui, pour avoir mis à notre disposition les ressources nécessaires à la réalisation de ce projet et la confiance qu'ils m'ont témoigné

Nous tenons à exprimer notre vifs remerciements à madame belferah rachida et amina safa chaouech et tous l'équipe du laboratoire de hall technologie

Finalement, on adresse nos sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs actions, leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions et ont accepté à nous rencontrer et répondre à nos questions durant nos recherches.

Dédicace

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi, et

qui m'ont donné un magnifique modèle de labeur et de persévérance. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez

depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.
Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

A mes chers et adorable frères et sœur que j'aime profondément : Mouhamed, Abdelwaheb, Youcef et Imen. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.
A mon petit adorable neveu que j'aime de tous mon coeur Louay.

À mes amis de toujours : Fatima, Zineb.H, Zineb.Z, Asma, Imen..

En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

A ma chère binôme Nawel, ma douce sœur qui a eu la patience de me supporter durant ce mémoire, et qui m'a soutenu et encouragé pendant tous les moments difficiles vécus, je t'aime beaucoup ma chère.

Une spéciale dédicace a cette personne qui compte déjà énormément pour moi, et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect. a toi Nassim.

Soumia Atsamnia

Dédicace

A la mémoire de ma chère maman que j'ai tant aimé qu'elle assiste à ma soutenance.

A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, à toi mon père.

A tous mes frères, Mohamed, Ahmed , Yucef ,mes sœurs , fatma Zohra, Malika , Hafidha , Ghania et Fadhila.

A tous mes amies , Imen , Nadia , Rafika , Asma et Khatima.

aux personnes qui m'ont toujours aidé et encouragé qui étaient toujours à mes côtés, et qui m'ont accompagnaient durant mon chemin d'études supérieures, collègues d'étude de promotion 2014.

A ma chère binôme et amie Soumia, avec laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler. Nous avons formé une belle équipe.

Nawel Blaifi

ملخص

ركزت الدراسة الحالية على إنتاج مادة حيوية فعالة سطحيا بواسطة بكتيريا من نوع لكنيفورمي العصوية على شكل حر و مجمد. بالنسبة للخلايا الحرة يقوم العمل على اختيار الظروف الأمثل للزراعة من خلال إحداث تغيرات في مصدر الكربون و الازوت اللذان فحصا في درجة حرارة و حموضة ثابتتين .بهدف زيادة الإنتاجية التي تؤدي إلى المردود الأقصى .رفقت العملية بقياس التوتر السطحي و مؤشر الاستحلاب .بالنسبة للخلايا المجمدة تم اختيار التركيز الامثل لالجينات الصوديوم وكلوريد الكالسيوم و الكتلة الحيوية .تضمن العمل أيضا دراسة حركية و توصيفا لمعامل السطح المنتج بطرق التحليل الفيزيائية و الكيميائية الحيوية.

كلمة المفتاح : مفاعل سطحي , لشوفورمي العصوية , التوتر السطحي , مؤشر الاستحلاب

Résumé

La présente étude a porté sur la production d'un biosurfactant par l'espèce ***bacillus licheniformis*** sous forme libre et immobilisée .pour les cellules libres le travail repose sur l'optimisation des conditions de cultivation en impliquant des variations de sources de carbone et d'azote qui ont été examinés à pH et température constants, dans le but d'accroître la productivité qui mènent a un rendement maximal. Le procédé a été suivie par la mesure de la tension de surface, et d'indice d'émulsification E24.pour les cellules immobilisées, la concentration de l'alginate de sodium, du chlorure de calcium et de la biomasse ont été optimisées. Le travail comprit aussi une étude de la cinétique et une caractérisation du biosurfactant produit par les méthodes d'analyses physicochimiques et biochimiques.

Mot clés : biosurfactants, bacillus licheniformis, tension superficielle, indice d'émulsification,

ABSTRACT

The present study focused on the production of a biosurfactant by ***bacillus licheniformis*** species in free and immobilized form. for free Cells work is based on the optimization of cultivation conditions by involving changes in sources of carbon and nitrogen which were examined at constant pH and temperature, in order to increase productivity leading to maximum performance. The process was monitored by measuring the surface tension, emulsification and index E24.for the immobilized cells, the concentration of sodium alginate, calcium chloride and biomass were optimized. The work also realized a study of the kinetics and characterization of biosurfactant produced by physicochemical and biochemical analysis methods.

Key word : biosurfactant , *bacillus licheniformis,* surface tension, emulsification index

Sommaire

Introduction générale……1

Chapitre I : étude bibliographique

I.1 : Généralité sur les biosurfactants……4

I.1.1 : Définition……4

I.1.2 : Structure ……..4

I.1.3 : Type des biosurfactants……5

I.1.4 : Micro organisme producteurs……..6

I.1.5 : Classification……7

I.2 : Avantages des biosurfactants……9

I.3 : Propriétés des biosurfactants……..10

I.3.1 : Abaissement de la tension superficielle……..10

I.3.2 : Abaissement de la tension interfaciale……11

I.3.3 : Des agents moussants……11

I.3.4 : Des agents mouillants……11

I.3.5 : Des agents émulsifiants……11

I.3.6 : Pouvoir détergent……11

I.3.7 : Concentration micellaire critique ……12

I.3.8 : Solubilisation et biosurfactants dans l'eau……12

I.3.9 : Toxicité et biodégradabilité……13

I.4 : Application des biosurfactants……13

I.4.1 : Domaine d'environnement……..14

I.4.2 : Domaine d'agriculture……..15

I.4.3 : Domaine de l'industrie alimentaire……15

I.4.4 : Cosmétique……..15

I.4.5 : domaine pharmaceutique et thérapeutique……15

I.5 : Contrainte avec l'utilisation des biosurfactants……..17

I.6: Mécanisme de production des biosurfactants……17

I.6.1 : Production associée à la croissance……17

I.6.2 : Production dans des conditions de croissance limitées……..17

I.6.3 : Production avec l'addition des précurseurs……18

I.6.4 : Production par cellules immobilisées……18

I.7 : Facteurs influençant la production des biosurfactants……..18

I.7.1 : Influence de la source de carbone……18

I.7.2 : Influence de la source d'azote……19

I.7.3 : Influence de PH……19

I.7.4 : Influence des sels minéraux……..19

I.7.5 : Influence de l'oxygène……19

I.7.6 : Influence de la vitesse d'agitation……19

I.8 : Identification des biosurfactants……20

I.9 : Immobilisation cellulaire……20

Conclusion……23

Chapitre II : méthodes et matériel

Introduction ……25

II-1 : Origine des souches bactériennes…… ……25

II-2 : Isolement et purification des souches bactériennes……..26

II-3 : Identification des souches purifiées…… ……27

II-3 -1 : Etude morphologique……27

II-3-2 : Etude biochimique ……28

II-4 : Production du biosurfactant …… ……29

II-4-1 : Micro-organisme et milieu de culture……29

II-4-2 : Méthode analytique ……30

II-4-3 : Optimisation des paramètres opératoires……32

II-4-3-1 : Optimisation de source de carbone de biosurfactant……32

II-4-3-2 : Optimisation de la concentration de source de carbone ……32

II-4-3-3 : Optimisation de source d'azote…… ……32

II-4-3-4 : Optimisation de la concentration de la source d'azote……32

II-5 : Etude cinétique de la production par cellules libre ……32

II-6 : Extraction de biosurfactant……33

II-7:Caractérisation du biosurfactant……..34

II-7-1 : Caractérisation structurale……..34

II-7-2 : Caractérisation physico-chimique……34

II-8 : Concentration micellaire……34

II-9 : Effet anti- microbien ……35

II-10 : Production par cellules immobilisées……35

II-10-1 : Préparation des Cellules immobilisées ……35

II-10-2 **:** La production par les cellules immobilisées ……35

Chapitre III : Résultats et discussions

III- Les paramètres optimaux ……..37

III-1 : Effet de la source de carbone…….....37

III-2 : Effet de la concentration de la source de carbone……..39

III-3 : Etude de l'influence de source d'azote……40

III :4 Effet de la concentration de la source d'azote ….……..42

III-5 : L'étude de la cinétique de production……43

III-6 : Production par Cellules Immobilisées……45

III-7 :L'étude de la cinétique de production de cellules immobilisées ……45

III-8 : Extraction de biosurfactant ……46

III-9**:** Caractérisation de biosurfactant……47

III-10 : Etude de stabilité du biosurfactant……..49

III-11 : La Concentration micellaire ……52

III-12 : Identification de la souche bactérienne K2N……54

III-12-1 : Caractères macromorphologiques…….....54

III-12-2 : Caractères micro morphologiques …….....54

III-12-2 : Résultats des tests biochimiques……55

Conclusion générale ……..57

Références bibliographiques

Annexe

Liste des figures -

Figure 1 structure d'un biosurfactant……5

Figure 2 Type des biosurfactants……...6

Figure 3 Représentation schématique d'une micelle de surfactant……12

Figure 4 Localisation de la région de Hassi Messaoud……26

Figure 5 Sols contaminés par le pétrole brut…….. ..26

Figure 6 Incubateur shaker……...30

Figure 7 Tensiomètre à anneau ……..31

Figure 8 Mesure du E_{24}……31

Figure 9 Extraction de biosurfactant……...31

Figure 10 Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant….38

Figure 11 L'indice d'émulsification de la source de carbone ……38

Figure 12 Influence de concentration du gasoil sur la TS de *K2N*……39

Figure 13 L'indice d'emulsification.de déférents concentration du gasoil……39

Figure 14 Variation de La tension superficielle en fonction de la source d'azote….41

Figure 15 l'indice d'émulsification de la source d'azote……42

Figure 16 L'optimisation de la concentration de la source d'azote……42

Figure 17 L'indice d'emulsification de la concentration de la source d'azote……42

Figure 18 L'étude cinétique des cellules libres……44

Figure 19 Les billes de cellules immobilisées ……45

Figure 20 L'étude cinétique des cellules immobilisée……...46

Figure 21 Mécanisme d'extraction de biosurfactant par l'acétone……..47

Figure 22 Spectre FTIR de biosurfactant produit par la souche *K2N*……48

Figure 23 La structure primaire de lichenysine A……..49

Figure 24 L'influence de la variation du pH……50

Figure 25 L'influence de la variation de température sur la stabilité du biosurfactant…….51

Figure 26 L'influence de la salinité sur la stabilité du biosurfactant……52

Figure 27 La tension superficielle en fonction de la concentration en biosurfactant…….53

Figure 28 L'aspect microscopique de la souche *K2N……..55*

Figure 29 Résultat de la galerie biochimique Api 50 CH……..56

Liste des tableaux -

.

Tableau 01	Types des biosurfactants et les microorganismes producteurs
Tableau 02	Application des biosurfactants selon leurs fonctions.
Tableau 03	Application thérapeutique des biosurfactants
Tableau 04	Caractéristiques des cellules immobilisées.
Tableau 05	La tension superficielle de différentes sources du carbone.
Tableau 06	La tension superficielle en fonction de la concentration du gasoil.
Tableau 07	L'influence de la source d'azote sur la tension superficielle.
Tableau 08	La tension superficielle en fonction de concentration de source d'azote
Tableau 09	Etude cinétique des cellues libres
Tableau 10	Comparaison des caractéristiques du biosurfactant obtenu par cellule libre et immobilisée
Tableau 11	Les groupement caractéristiques des biosurfactants
Tableau 12	Variation de tension superficielle en fonction de la concentration du biosurfactant
Tableau 13	Les caractères macroscopique de la colonie isolée a partir de la souche *K2N* sur le gélose nutritif.
Tableau 14	Les résultats des tests biochimique après lecture de l'Api 50 CH

- Liste de l’abréviation -

CMC : concentration micellaire critique.

HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique.

TS : la tension superficielle.

MM : Milieu minimum.

T_{incub} : Température d’incubation.

E : La longueur de la couche émulsionnée.

E’ : La longueur totale du mélange.

E_{24} : L’indice d’émulsification.

K_2N : nom de la souche bactérienne

Apl 50CH : nom des galeries

- Nomenclature -

Symbole	Signification
m/v	Masse par volume (en g/ml)
L	Litre
v/v	Volume par volume (en ml/ml)
tr/min	Tour par minute
Dyne/Cm	Dynes par centimètre
mN/cm	Millinewton/mètre
Ml	Millilitre
g/l	gramme par litre
%	Pourcentage
H	Heure
°C	degré Celsius
Min	Minute
g/ml	gramme par millilitre
γ	La tension superficielle (en dyne/cm)

Introduction général

Les tensioactifs sont des molécules amphipathiques qui se répartit préférentiellement à l'interface entre des phases fluides telles les interfaces huile / eau ou air/eau .ces propriétés de surfactant capables de réduire la tension superficielle et interfaciale et rendre le tensioactif des excellents agents détergents, émulsionnants, moussants et dispersants.

Les tensioactifs sont largement utilisés à des fins industrielles, agricoles, alimentaires, cosmétiques et application pharmaceutique toutefois la plupart de ces composés sont synthétisés chimiquement et causer des problèmes d' environnement et de la toxicologie, en raison de la nature réfractaire et persistante de ces substances (Makkar et Rockne, 2003). Avec les progrès actuels de la biotechnologie, l'attention a été accordée au processus respectueux de l'environnement alternatif pour la production de différents types de biosurfactants de micro-organismes (Loftabad *et al,* 2009).

La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (VIPULANANDAN et REN, 2000). C'est pourquoi, depuis quelques années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes : les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Ceux-ci possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non toxiques et ont une capacité élevée de formation de mousse, une plus grande sélectivité, l'activité spécifique à température extrême, le pH et la salinité, la capacité à synthétiser à partir de substrats renouvelables et l'acceptabilité écologique (Fontes et al., 2008).

Bien que les biosurfactants les plus connues sont d'origine bactérienne, tel que rapporté par Abouseoud et al. (2008), Wu et al. (2008), Das et al. (2009), Pansiripat et al. (2010), Abbasi et al. (2012), Eddouaouda et al. (2012), Khopade et al. (2012a, b), Sousa et al. (2012) et Burgos-Díaz et al. (2013), l'étude de la production biosurfactant par des bactéries a pris de l'ampleur, la production étant signalé principalement par genres *Candida sp., Pseudomonas sp. et Yarrowia sp.* (Morita et al, 2007, 2008;. Ilori et al, 2008;. Luna et al, 2009 . Batista et al, 2010, Daverey et Pakshirajan, 2010; Luna et al, 2011, 2012;. Accorsini et al. , 2012; Fontes et al, 2012;. Rufino et al, 2012 ,Chung et al,

(2013). *Pichia spp*. Sont des bactéries très intéressantes du point de vue des applications environnementales (Walker, 2011).

Les biosurfactants incluent un grand nombre de structure chimique, comme les glycolipides, les lipopeptides des complexes polysaccharides - protéines, les phospholipides et les acides gras

La source de carbone et source d'azote utilisés pour la croissance peut être des hydrocarbures ou des carbohydrates, qui jouent un rôle important sur le rendement et la structure de biosurfactant, certains microorganismes se développent uniquement sur des hydrocarbures, d'autres exigent un milieu contenant des sucres et des acides aminés

La recherche sur la production de tensio-actif biologique a augmenté de .façon significative en raison des avantages qu'ils présentent par rapport aux composés synthétiques. Actuellement, la production de biosurfactants est très coûteux en raison de l'utilisation de milieux de cultures synthétique. Par conséquent, l'accent est mis sur l'acquisition de divers substrats agro-industrielle à bas prix, y compris huiles végétales, la distillerie et déchets des produits laitiers, de la mélasse de soja, graisses animales et déchets et féculents comme matières premières. Ces déchets peuvent être utilisés comme substrats pour la production à grande échelle de biosurfactant avec une technologie avancée.

L'objectif du projet est la synthèse et la caractérisation d'un agent biosurfactant par la souche indicé ***K2N.*** L'étude s'effectue dans des cultures en batch de ces cellules sous formes libres et immobilisés utilisant des différents sources de carbones et d'azotes.

L'influence de facteurs physicochimiques tel que la nature des substrats nutritifs ainsi leurs rapports de concentrations, seront étudiés afin de déterminer les conditions optimales de production de biosurfactant.par la mesure de la tension superficielle et l'indice d'émulsification

Le produit obtenu sera caractérisé par des méthodes physicochimiques et biochimiques par la mesure de la tension superficielle et l'indice d'émulsification.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1_ Généralité :

I.1.1_ Définition :

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés (DESAI et BANAT, 1997).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de biosurfactants: les cationiques qui possèdent une charge positive ; les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ; les non ioniques, sans charge et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents: l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre (WEST et HARWELL, 1992).

La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du biosurfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification (WEST et HARWELL,1992).

I.1.2_Structure :

Il s'agit de molécules amphiphiles (Prommachan, 2002), constituées de deux pôles: un pôle hydrophile, qui peut être un ester, un hydroxyle, un phosphate, un carboxyle, ou encore un groupe d'hydrates de carbone et peut avoir une charge neutre ou négative, et un pôle hydrophobe qui est un acide gras (Maier, 2003, Marqués et *coll*., 2009) hydroxylé, saturé ou insaturé, et peut être aussi un peptide (Banat, 1995)

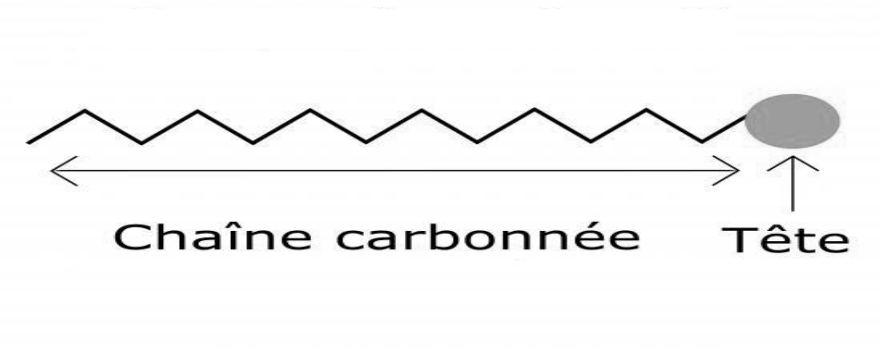


Figure 01 : structure du biosurfactant

I.1.3_Type des biosurfactant :

La revue bibliographique révèle que la majorité des biosurfactants sont de type anionique ou non ionique (Cameotra et Makkar, 1998 ; Bognolo, 1999).. Il existe peu de structures cationiques (Mulligan et al., 2001) : cependant et dans certains cas, la présence de groupements contenant des atomes d'azote confère un certain caractère cationique à la molécule, ce qui va influencer ses propriétés d'adsorption ou de floculation par exemple.

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de biosurfactants:

- **Les cationiques:** qui possèdent une charge positive.
- **Les anioniques:** agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels qui s'ionisent en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement.
- **Les non ioniques:** sans charge.
- **Les amphotères:** qui possèdent deux groupements hydrophiles différents: l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre (WEST et HARWELL, 1992).

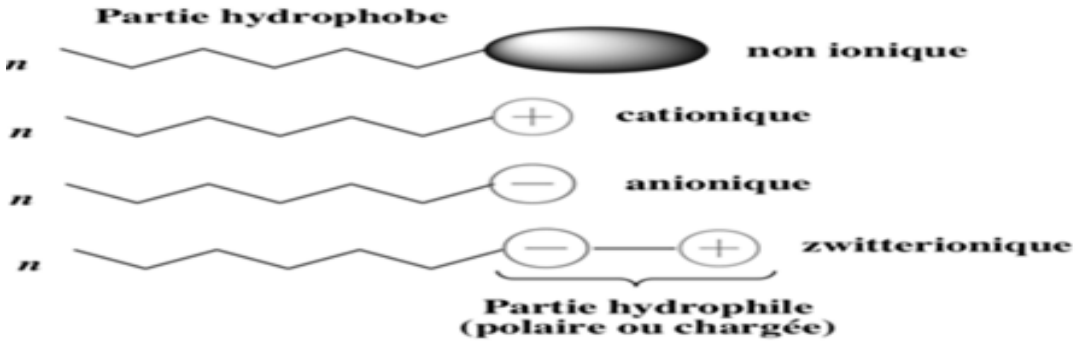


Figure 02 : type des biosurfactants (E.jaspart (2012)).(chapitre I)

I.1.4_ Micro-organismes producteurs des Biosurfactants :

Les biosurfactants sont principalement produits par des micro-organismes se développant de manière aérobie (Mulligan et al., 2001) dans un milieu aqueux contenant une ou plusieurs sources de carbone, comme des hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures (Bognolo, 1999 ; Mulligan et al., 2001**).** Ces organismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries (Tableau 01). Les plantes, les animaux ou les humains sont également capables d'en produire (Christofi et Ivshina, 2002).

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

Les bactéries utilisées pour produire les biosurfactants sont en général issues de sols contaminés par des molécules hydrophobes comme les Hydrocarbures aromatiques polycycliques . 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. Dans tous les cas, le biosurfactant obtenu est un mélange de plusieurs molécules.

I.1.5_ Classification des biosurfactants :

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

- Les glycolipides: sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques (RON et ROSENBERG, 2002).

- Les lipopeptides: sont composés d'un lipide attaché à une chaîne polypeptide. Lipides d'ornithine sont les plus connus (HEALY et *al*., 1996).

-Les phospholipides: sont formés de groupements alcool et phosphate et de chaîne lipidique (BOGNOLO (1999).

- Les lipopolysaccharides: ou polymériques sont constitués d'une ou plusieurs unités saccharides et d'acides gras. (HEALY et*al*., 1996).

-Acides gras et les lipides neutres: Les acides gras produits à partir d'alcanes à la suite d'oxydations microbiennes ont été considérés comme des agents de surface. En plus des acides à chaîne droite, les microorganismes produisent les acides gras complexes contenant des groupes OH et des branches alkyliques. Des exemples de tels acides complexes c'est les acides Corynomucoliques, qui sont aussi les agents de surface (Van Dyke.M.I et al 1993).

Tableau 01: les types des biosurfactants et les micro-organismes producteurs (BANAT et *al*., 2000).

Type de Biosurfactant	Micro-organismes
Glycolipides	*Rhdococcus erythropolis*
Trehalipides	*Nocardia erythropolis*
Trehalose Dimycolates	*Mycobacterium sp*
Trehalose dicorynemycoaltes	*Nocardia sp*

Rhamnolipides Sophorolipides Cellobiolipides	*Arthrobacter sp* *Corynebacterium sp* *Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas sp* *Torulopsis bombicola* *Torulopsis apicola* *Torulopsis petrphilum* *Torulopsis sp* *Ustilago zeae* *Ustilago maydis*
Lipopeptides et lipoprotéine Peptide-lipide Viscosin Surfactine Subtilisine Polymyxins	*Streptomyces sp* *Corynebacterium sp* *Mycobacterium sp* *Bacillus licheniformis* *Pseudomonas fluorescens* *Bacillus subtilis* *Bacillus subtilis* *Bacillus polymyxa*
Phospholipides	*Candida sp* *Corynebacterium sp* *Micrococcus sp* *Tbiobacillus sp*
Acides gras et lipides neutres	*Acinetobacter sp* *Pseudomonas sp*

	Micococcus sp *Mycococcus sp* *Candida sp* *Peenicillium sp*

Du fait de leur forte production et de leurs propriétés tensioactives importantes, les biotensioactifs les plus communs et les plus étudiés sont les glycolipides et les phospholipides, le tableau 01 représente les types des biosurfactants ainsi que leurs origines. (DESAI et BANAT, 1997).

I.2 Avantages des biosurfactants :

Les recherches ont montré que biosurfactants présentent de nombreux avantages par rapport aux tensioactifs synthétisés chimiquement. Voici quelques-uns des avantages de biosurfactants (Kosaric, 1992; Mulligan et Wang, 2006).

- **Biodégradabilité:** Biosurfactants sont facilement dégradés par les bactéries et d'autres organismes microscopiques, d'où ils ne posent pas beaucoup de menace pour l'environnement. (Mulligan, 2005 ; Mohan *et al*., 2006**).**

- **Généralement faible toxicité:** par exemple glycolipides de *Rhodococcus* sp. 413A sont 50% moins toxique que le Tween 80 dans des essais de solubilisation du naphtalène (kanga *et al.,* 1997).

- **Biocompatibilité et la digestibilité:** Cet avantage assure leur application dans des produits cosmétiques, les produits pharmaceutiques et les additifs alimentaires fonctionnels (Pattanathu, et al .,2008).

- **Disponibilité des matières premières:** Biosurfactants peuvent être produits à partir de matières premières qui sont disponibles en grandes quantités. (Pattanathu, et al .,2008).

- **Économie de la production acceptables:** Selon son application, biosurfactants peuvent également être produits à partir de déchets industriels et des sous-produits, et

c'est un intérêt particulier pour leur production en vrac. (Pattanathu, et al .,2008).

- **Utilisez le contrôle de l'environnement:** Biosurfactants peuvent être efficacement utilisés dans le traitement des émulsions industrielles, le contrôle des déversements d'hydrocarbures, la biodégradation et la détoxification d'effluents industriels et la bioremédiation des sols contaminés.(Pattanathu, et al .,2008).

- **Spécificité:** Biosurfactants étant des molécules organiques complexes avec des groupes fonctionnels spécifiques sont souvent spécifiques dans leur action. Ce serait d'un intérêt particulier dans la détoxification des polluants spécifiques, dé-émulsification d'émulsions industrielles, cosmétique spécifique, pharmaceutique et applications alimentaire (Pattanathu, et al .,2008).

Caractéristiques techniques excellentes :

- abaissement de la tension interfaciale (~ 0.1dyne/cm).
- abaissement de la tension superficielle (~27 dyne/cm).
- Emulsification (50-100%).
- pouvoir moussant (mousse stable(15 min.)).
- pouvoir mouillant (abaissement de l'angle de contact > 30%).
- CMC (20-2000 mg/l).
- pouvoir antibiotique ou fongicide.
- Stabilité thermique et chimique : plus stables que les surfactants synthétiques. T(4-100°C); pH (4-9); salinité (5%-20%).
- Caractéristiques écologiques: biodégradables (100%), non toxiques, biocompatibles, d'où la possibilité de leur utilisation dans les préparations pharmaceutiques et agroalimentaire. (Abouseoud.M (2008))

I.3_ Propriétés des biosurfactants :

I.3.1_ Abaissement de la tension superficielle :

La tension superficielle est définie comme étant la force existant à la surface d'un liquide du à l'attraction entre les molécules qui s'opposent à la rupture de la surface (holemberg et al..2001). Elle s'exprime en Dyne.Cm^{-1} (=$mN.m^{-1}$).

Les biosurfactant diminuent considérablement la tension superficielle de l'eau, même dans les solutions très diluées. ceci apparait dans l'exemple : la tension superficielle de l'eau pure est de 62.80 mN/m à 20°c et en présence d'un biosurfactant, elle peut atteindre approximativement une valeur de 30 mN/m (Holmberg et al.,2001).

I.3.2_Abaissement de la tension interfaciale :

La tension interfaciale est la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles (Neindre, 1993).

La tension interfaciale 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).

1.3.3_Les agents moussants :

La formation de mousse, dispersion d'un volume important de gaz dans un faible volume de liquide, nécessite la présence d'agents tensioactifs qui s'adsorbent à l'interface eau- air. (Référence : identification phenotypique de souches bacteriennes isolees localement et production d'un biosurfactant)

1.3.4_ Les agents mouillants :

Le mouillage d'un solide par un liquide correspond à l'étalement du liquide sur le Solide. En diminuant la tension superficielle, les agents mouillants permettent un plus grand étalement du liquide

1.3.5_ Les émulsifiants :

Un émulsifiant permet de mélanger deux liquides non miscibles, par exemple de l'eau et de l'huile. Un des liquides est dispersé dans le second liquide sous forme de petites gouttelettes.(refernce)

1.3.6_Pouvoir détergent :

La détersion est définie comme le déplacement à l'aide d'une solution aqueuse de toute sorte de contamination graisseuse rencontrée, généralement, sur les surfaces solides.

1.3.7_Concentration micillaire critique (CMC) :

La CMC est par définition la concentration en solution d'un agent de surface au-dessus de laquelle une partie des molécules dispersées au sein de la solution se ressemblent pour former des micelles (pore, 1992).

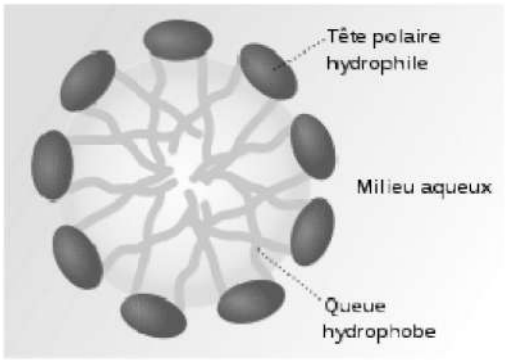


Figure 02 : Représentation schématique d'une micelle de surfactant (pore ,1992).

La CMC peut également être définie comme étant la concentration pour laquelle la tension superficielle devient minimale (environ 30 ($mN.m^{-1}$)) en solution aqueuse).pour de nombreux tensioactifs, la tension superficielle minimale est à peu près identique mais la CMC varie en fonction de leur structure.la plupart des biosurfactants ont des CMC inférieures et des nombres d'agrégation supérieures aux surfactants synthétiques : leur efficacité est donc meilleure **(**Mata-Sandoval et al 2000**)** ,les CMC obtenues pour les biosurfactants varient de 1 à 200 ($mg.L^{-1}$ **)(**Zhang et Miller, 1992 ; Abalos et al.,2001).

1.3.8_Solubilisation et biosurfactants dans l'eau :

Les agents tensio-actifs, au dessus de leur concentration micellaire critique augmentent, de façon significative, la solubilité des produits insolubles ou peu solubles dans l'eau. Ce phénomène est appelé ''solubilisation'' (Marcou, 1989)**.**

La solubilité des biosurfactants dans l'eau ou dans les hydrocarbures dépend du nombre de liaison C-C présentes dans la partie lipophile de la molécule du biosurfactant (Mimouni, 1995), c'est-à-dire :

- Si la longueur de la chaine (de la partie lipophile) est inférieure à 12 liaisons C-C, le surfactant est soluble dans l'eau.

- Si la partie non polaire (lipophile) a plus de 16 liaisons C-C le surfactant est non soluble dans l'eau.

Cette propriété de solubilité devient aisée quand il y a formation de micelle, car la molécule individuelle du biosurfactant est relativement peu soluble dans l'eau, du fait qu'elle renferme une partie hydrocarbonée importante insoluble dans l'eau, par contre la micelle réalise des conditions meilleures de solubilité puisque les parties hydrocarbonées sont soustraites à l'eau et que sa surface est recouverte par l'ensemble hydrosoluble (Mimouni, 1995).

1.3.9_Toxicité et biodégradabilité :

Il existe de nombreux travaux sur la toxicité des surfactants chimiques, mais peu de recherches ont été effectuées sur les biosurfactants. (Edwards et al.(2003) ont comparé la toxicité de trois surfactants chimiques et biologiques sur deux invertébrés marins (Mysidopsis Bahia et Menidia Beryllina). Ces auteurs concluent que les bio tensioactifs ont des toxicités intermédiaires à celle des chimiques.

Des tests de toxicité (oculaires et dermiques) réalisés par (Haba et al.(2003) ont montré que les rhamnolipides produits par une souche de pseudomonas aeruginosa étaient classés comme produits non irritants et non toxiques.

De nombreux auteurs indiquent que les bio tensioactifs sont biodégradables (parra et al., 1989 ; Herman et al., 1995); (Banat et al.,2000 ;Vipulanandan et Ren,2000). Une étude réalisée par (descènes et al. (1996)), reporte que l'UG2, biosurfactant produit par une souche de pseudomonas aeruginosa n'affectait pas l'activité microbienne globale, même à de fortes concentrations (500 µg de tensio-actif. g^{-1} de sol).

I.4_Applications des biosurfactants :

Les applications industrielles des agents de surface sont classées en fonction de la façon dont elles sont appliquées. Ce sont les agents de surface utilisés dans les détergents et les produits de nettoyage (54%); comme auxiliaires pour les textiles, le cuir

et le papier (13%), dans les processus chimiques (10%), dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques (10%); dans l'industrie alimentaire (3%); dans l'agriculture (2%) et dans d'autres (8%).

Tableau 02 : application des biosurfactants selon leurs fonctions (**Gabet.S (2004)).**

Fonction	**Champ d'application**
Emulsifiant et dispersant	Cosmétique, peinture
Solubilisant et micro émulsifiant	Pharmaceutique, articles de toilette
Détergent Nettoyants	ménagers, produits de l'agriculture ou de haut technologie
Agent mouillant et pénétrant	Pharmaceutique, industrie textiles, peinture
Agent moussant	Cosmétique, article de toilette
Agent épaississant	Peinture
Récupération des ressources	Récupération assistée de pétrole
Dé-émulsifiant	Traitement des déchets
Agent réducteur de viscosité	Transport par pipeline

I.4.1_Domaine d'environnement :

Dans le domaine de la protection de l'environnement et la remédiation, les biosurfactants (Rhamnolipides) sont utilisés dans la dépollution marine et des sols contaminés par les hydrocarbures (Lang Wallbrant, 1999).

I.4.2_Domaine d'agriculture :

En agriculture, les biosurfactants sont utilisés, en particulier, dans la formulation d'herbicides et de pesticides (Lang et Wallbrant, 1999).

I.4.3_Domaine de l'industrie alimentaire :

Biosurfactants ont de nombreuses applications dans les industries alimentaires, tels que pour contrôler l'agglomération des globules gras, de stabiliser les systèmes gazeuses, d'améliorer la texture et la durée de conservation des produits contenant de l'amidon, de modifier les propriétés rhéologiques de la pâte de blé et d'améliorer la consistance et la texture des produits à base de graisse. Dans l'industrie alimentaire, biosurfactants sont utilisés comme émulsifiants dans la transformation des matières premières. (Kachholz & Schlingmann, 1987).

I.4.4_ Cosmétique :

On distingue deux grands domaines, la cosmétique rincée (produits d'hygiène lavants tels que les shampooings, gels douches, dentifrices) et la cosmétique blanche (produits de beauté tels que les crèmes, laits, maquillages et autres produits de soin). La cosmétique rincée 29 utilise les surfactants pour leur propriété détergente tandis que la cosmétique blanche privilégie le pouvoir adoucissant et émulsifiant. (virgine NETO (2007)).

I.4.5_Domaine pharmaceutique et thérapeutique :

Biosurfactants ont un large éventail d'applications dans les domaines pharmaceutiques (Mukherjee et al. 2006). Plusieurs biosurfactants ont été signalés à posséder antifongique, antibactérienne, antivirale, antimycoplasma, immunomodulateur et activités antitumorales (Desai et al 2008;. Gharaei-Fathabad 2011; Krasowska 2010; Mukherjee et al. 2006; Muthusamy et al. 2008; Okoliegbe et Agarry 2012; Rodrigues et al. 2006; Rodrigues et Teixeira 2010; Seydlová et Svobodová 2008; Sriram et al. 2011; Zhao et al 2010). Toutefois, leur pratique utiliser en tant que médicaments thérapeutiques est dans une certaine mesure limitée par leur activité hémolytique et cytotoxicité envers des lignées de cellules animales normales (Nasrollahi1 et al 2012.; Rodrigues et Teixeira, 2010a; Rodrigues et Teixeira, 2010a; Rivardo et al. 2009). Actuellement, les demandes de

microbulles à base de biosurfactants fournissent un approche thérapeutique prometteuse pour les traitements ciblés (Xu et al. 2011) à base de biosurfactants.

L'utilisation et l'application commerciale potentielle des biosurfactants dans le domaine médical ont augmenté au cours de la dernière décennie. Leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales rendent molécules pertinentes pour des applications dans la lutte contre de nombreuses maladies et comme agents thérapeutiques. En outre, leur rôle d'agents anti-adhésifs contre plusieurs agents pathogènes indique leur utilité comme agents de revêtement anti-adhésif approprié pour les matériaux d'insertion médical conduisant à une réduction dans un grand nombre d'infections nosocomiales, sans l'utilisation de médicaments et de produits chimiques de synthèse. Cet examen porte sur les perspectives médicinales et thérapeutiques sur les applications biosurfactant. (Rodrigues et al .,(2006).

Tableau 03 : Applications thérapeutiques des biosurfactants. (Fiechter .A (1992)).

Biosurfactant	**organisme**	**Application**
Surfactin	*Bacillus subtilis*	Agent anti- mycoplasme
Iturin	*Bacillus subtilis*	Agent antifongique
Pumilacidin		Agent antiviral Propriétés anti-ulcère
Lipopeptides	*Streptosporangium* *Amethystogenes sub sp Fukuiense AI-23456*	Facteur simulant de colonie de Granulocyte (G-CSF) et facteur stimulant de colonie de granulocyte macrophage (GM-CSF) induisant l'activité

Glycolipides	*Condida antarctica T-34*	Agent anti –tumoraux
Succinoyl-tréhalose lipide	*Rhodococcus erythropolis*	Inhibition de croissance recto de virus d'herpès et de virus de gripe
Dicorynomycolate tréhalose		Propriétés antifongiques

1.5_Contraintes avec l'utilisation des biosurfactants :

- Faible rendement de production (2-100 g/l).
- Difficultés de séparation et de purification.
- Coût élevé (rhamnoilpid (Jeneil) 320$/kg).

Solutions envisageables ?

- Utilisation de matière première non conventionnelle déchets industriels, agroalimentaire,…
- Améliorations des souches par modifications génétiques. (Abouseoud.M (2008)

I.6_Mécanisme de production des biosurfactants :

I.6.1_ Production associée à la croissance :

La biosynthèse des rhamnolipides par des souches de *pseudomonas aeruginosa* se réalise pendant la phase exponentielle de croissance et est due à un transfert séquentiel glycosyl catalysé par des transférases rhamnosyl spécifique [36]. La biodispersan par les espèces de *Bacillus LAF-343.* De glycoprotéine par *pseudomonas fluorescens 378.* (Dessai et al., (1997))

I.6.2_Production dans des conditions de croissances limitées :

Ce type est caractérisée par une augmentation forte de la production de biosurfactant en raison de la limitation d'un ou plusieurs composants comme par exemple

l'azote et le fer pour les espèces de *pseudomonas***,** la production de bioémulsifiant par *condida tropicalis IIP4*, de glycolipides par *Nocardia sp SFC-D*, et de hydrosoluble biosurfactant par *torulopsis apicola.* (Dessai et al., (1997))

I.6.3_Production avec l'addition de précurseurs :

Des chercheurs ont montré que l'addition des biosurfactant au milieu de croissance résulte à des changements qualitatifs et quantitatifs du produit, par exemple, l'addition des composés comme le trisaccharides dans le milieu de culture contenant l'espèce de *Nocardia corynebactérie* ont eu comme conséquence la production accrue de biosurfactants avec un rendement environ 120 à150 g/l**. (**Dessai et al., (1997))

I.6.4_Production par des cellules immobilisées :

La production par les cellules immobilisées est un type de production de biosurfactant dans lequel il n'y a aucune multiplication de cellules. **(**Dessai et al., (1997)). L'immobilisation permet de retenir les cellules microbiennes fixées sur un support poreux dans un système de fermentation et d'obtenir ainsi de hautes densités de biomasse. (Mata-Sandoval et al**.**,(2000)).

La production de biosurfactant en reposant des cellules est importante pour la réduction de coût de rétablissement de produit, car la croissance et les phases de formation de produit peuvent être séparées.

Parmi les exemples de production par des cellules immobilisées on cite :
La production de rhamnolipides par des souches de *pseudomonas aeruginosa CFTR-6,* de sophorolipides par *torulopsis apicola* et *condida apicola* ,cellobiolipides par *Ustilago maydis*,de tetraester de tréhalose par les *Rhodococcus erytbropolis*, et la production de lipide de mannosylerythritol par *condida antarctique**.***

I.7_Paramètres influençant la production :

Un certain nombre de facteurs influent sur la production de biosurfactants. Ces facteurs incluent les facteurs environnementaux (température ; pH; agitation et taux d'oxygène) ainsi que de source de carbone et source d'Azote. (Rahman et al.,(2002))

I.7.1_ Influence de la source de carbone :

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. Les 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, comme des n-alcanes ou de l'huile d'olive (DESAI et BANAT, 1997). En effet, les bactéries ont la capacité de croître sur des substrats hydrophobes (CAMEOTRA et MAKKAR, 1998).

I.7.2_ Influence de l'azote :

De nombreuses études ont montré que la synthèse de rhamnolipides se produisait lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu ou lorsque l'azote était en quantité limitant. L'azote peut être apporté sous différentes formes selon les bactéries productrices (LANG et WULLBRANDT, 1999).

I.7.3_ Influence du pH :

Pour une souche de *Pseudomonas aeruginosa*, le pH du milieu de culture doit se situer entre 6,0 et 6,5. A des pH inférieurs ou supérieurs, la production de biosurfactants chute rapidement. D'autres souches comme *Norcardiacoryn bacteroi* sont inaffectées par des pH variant de 6,5 à 8,0 (ARINOet al.,1996**)**

I.7.4_ Influence des sels minéraux :

Il semblerait qu'une concentration limitant en ions magnésium, calcium, potassium sodium ou éléments traces induise une augmentation de production (GUERRA SANTOS et al., 1986).

I.7.5_ Influence de l'oxygène :

La disponibilité de l'oxygène peut également affecter la production à travers son effet sur l'activité cellulaire ou la croissance (GABET, 2004).

I.7.6_ Influence de la vitesse d'agitation :

Les milieux de culture sont agités lors de la production de biosurfactant. Pour les bactéries, une augmentation de la vitesse d'agitation induit une augmentation des vitesses de cisaillement et donc un rendement moindre. L'effet inverse est observé lorsque les organismes producteurs sont des levures (DESAI et BANAT, 1997)

I.8_Identification des biosurfactants :

Une fois les produits biosurfacatnts à sont purifiés, il faut déterminer leur structure, parmi les différentes analyses qualitatives on utilise le plus fréquemment :

- La spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violet et visible (UV-Vis) qui détecte la présence de chromophore (spoeckner et al., 1999),
- La spectrométrie infrarouge (IR) qui détermine le groupement fonctionnel (Peypoux et al. 1999),
- La spectrométrie de masse (MS) qui donne le poids moléculaire, des indications sur la structure et qui, à haute résolution, fournit l'analyse élémentaire de la molécule (Daniels et al. 1999).
- La résonance magnétique nucléaire à haute champs (RMN de proton et de carbone 13) indique la structure et la conformation des composés à analyser (Daniels et al. 1999).

I.9_ L'immobilisation cellulaire :

Il peut être défini comme des cellules physiquement confinées ou localisées dans une région définie de L'espace avec maintien de leurs activités catalytiques, pouvant être utilisées de façon répétitive et continue (Chibata et al., 1986)

Outre l'intérêt de réaliser des procédés en mode continus, l'immobilisation a l'avantage de permettre le maintien de concentrations cellulaires élevées. Ces deux points conduisent à une amélioration très nette de la productivité.

Le tableau 04 illustre les avantages et les inconvénients de la technique d'immobilisation cellulaire.

Tableau 04 : Caractéristique des cellules immobilisées

(Champagne et *al* ,1986 Navarro *et al.* 1985*)*

Avantages	Inconvénient
Les cellules présentent une stabilité accrue vis-à-vis de plusieurs paramètres: -stabilité thermique -période de demi-vie élevée (3 mois) -agitation -PH -Obtention de densité cellulaire (Uütiaie) élevée -Taux de production plus élevé qu'en fermentation classique -Contamination moins fréquente -Possibilité de CO-immobilisation -Mise en œuvre de procédé en continu: -plus grande versatilité dans l'élaboration de procédés en continu: -le produit devient aisément	-Le support d'immobilisation s'ajoute aux membranes cellulaires ce qui provoque certains problèmes -de transfert de masse: le substrat vers les cellules le produit vers le milieu de culture -Procédé de fabrication complexe -Activité spécifique inférieure

séparable des cellules -Modulation des activités physiologiques: -diminution des temps de doublement -synchronie -stabilité plasmidique	

Des différents polysaccharides naturels, c'est l'alginate et la carraghénane qui démontrent la meilleure stabilité mécanique et la meilleure activité cellulaire lors de la fermentation propionique gl L'alginate a été choisie comme matrice d'immobilisation pour son transfert de masse ainsi que pour l'expertise de l'équipe de recherche au niveau de la fabrication et de l'utilisation des billes d'alginate.

L'alginate est extraite d'une algue composée d'un copolymère d'acide D-mannuronique et L-guluronique.(Chibata, et al 1986)

Pour fabriquer les billes, une méthode d'extrusion est utilisée. Elle consiste à ajouter goutte a goutte une suspension d'alginate de Sodium et de cellules à une solution de chlorure de calcium. La goutte se solidifie dés qu'elle entre en contact avec le CaCl2, en résulte des billes de quelques millimètres de diamètre, dans lesquelles sont emprisonnées les cellules.

Conclusion

Biosurfactant est un surfactant naturel créé à partir de la fermentation qui peut remplacer les produits chimiques utilisés dans de nombreuses applications industrielles. Ils sont composés amphiphiles biologiques produits par un certain nombre de levures, de bactéries et de champignons filamenteux de diverses substances, y compris les sucres, les huiles et les déchets.

Biosurfactants présentent de nombreux avantages par rapport aux agents de surface tels que:

· Faible toxicité

· Biodégradabilité

· Matières premières:

· Spécificité des applications: Biosurfactants, en molécules organiques complexes avec des groupes fonctionnels, sont souvent spécifiques à leur action. (AbuRuwiada.A.S et al.,(1991))

MATÉRIELS

ET

MÉTHODES

Introduction

L'objectif de ce travail est la synthèse et la caractérisation d'un biosurfactant par des cellules libres et immobilisés appartenant à l'espèce de *baccillus lichnoformis*

L'étude s'effectue dans des cultures en batch de ces cellules sous formes libres et immobilisées utilisant des différentes sources de carbone (huile d'olive, Héxadécane …..) et d'azote.

L'influence des facteurs tel que la nature de substrat de nutrition (carbone, azote) seront étudie afin déterminer les conditions optimales de productions de biosurfactants par la mesure de tension superficielle et l'indice d'émulsification, la stratégie s'adopté est l'optimisation par étape, donc par variation d'un seul facteur à la fois, la cinétiques de production de biosurfactant sera établie.

Le produit obtenu sera caractérisé par des méthodes physicochimiques en étudiants la stabilités thermiques et chimiques, et identification par le spectre infra rouge.

II.1_Origine des souches bactériennes :

Le biotope utilisé, pour isoler des souches bactériennes aérobies, est un sol sableux contaminé par les hydrocarbures pétroliers de la région de Hassi-Messaoud, sud d'Algérie (figure 4). Les prélèvements d'échantillons ont été réalisés à différentes profondeurs. La méthode d'adaptation progressive, en utilisant le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, a permis d'isoler des souches à fort potentiel dégradatif des hydrocarbures et leurs dérivés. Les différentes caractéristiques de ce biotope sont données en annexe I (Eddouaouda, 2012).



Figure 4 **:** Localisation de la région de Hassi Messaoud

La figure (05) montre le biotope utilisé pour l'isolement des souches bactériennes à fort potentiel de dégradation hydrocarbures et productrices de biosurfactants.



Figure 5: Sols contaminés par le pétrole brut (Hassi-Messaoud) (Eddouaouda, 2012)

II.2_ Isolement et purification des souches bactériennes :

Toutes les étapes de l'isolement ont été réalisées dans le cadre de travaux de thèse de doctorat de Mr. Eddouaouda (2012) (voir annexe II).

- **Purification**

Après 24 h d'incubation, et à 37°C l'étape de purification des cultures permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes souches obtenues.

La sélection est basée sur l'aspect macroscopique des colonies : la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité…etc. Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé et ensuite purifié par repiquage successif selon la méthode de stries (MARTINNEAU, 1996).

- **Conservation des souches isolées**

Les souches isolées sont conservées dans des tubes à essai contenant le milieu gélose nutritive incliné.

Les souches sont ensemencées en stries sur la pente des tubes, puis incubées à 45°C pendant 24 heures.

Les tubes dans lesquels il y a eu une croissance seront bouchés et conservés à 4°C pour une durée de 4 à6 semaines. Afin de pouvoir toujours disposer de souches viables, la réactivation doit se faire tous les mois (MARTINNEAU, 1996).

II.3_ Identification des souches purifiées :

L'identification des souches isolées est réalisée en se basant sur les études morphologique et biochimique.

II.3.1_Etude morphologique :

A/ Aspect macroscopique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une Première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. D'après **SINGLETON(1999**), les éléments d'identifications macroscopiques sont:

- La forme des colonies : rondes, irrégulières,…etc.
- La taille des colonies par la mesure du diamètre.
- La Chromogène : couleur de la colonie.
- L'élévation: convexe, concave, plate.
- L'opacité: opaque, translucide ou transparente.
- La surface: lisse, rugueuse, sèche, dentelée,…etc.

B/ Aspect microscopique

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes à l'état frais et après une coloration de GRAM :

***Etat frais* :** permet de déterminer la forme, l'arrangement et la mobilité des bactéries

Il consiste en l'observation d'une goutte de suspension bactérienne, préparée avec de l'eau physiologique et placée entre lame et lamelle.

L'observation se fait au microscope photonique à grossissement X 100 (SINGLETON, 1999).

***Coloration de GRAM* :** est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une couche de peptidoglycane mince sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (GRAM-), alors que celles qui possèdent une couche de peptidoglycane épaisse vont retenir le colorant (GRAM+).

La consistance et la valeur de la coloration de Gram correspond à des différences biochimiques entre la paroi des bactéries Gram positif et les bactéries Gram négatif (MARCHAL et BOURDON, 1982).

II.3.2_Etude biochimique :

L'étude biochimique nous oriente sur le métabolisme suivit par les microorganismes étudiés et les enzymes qu'ils possèdent.

Ces tests ont été réalisés en utilisant la galerie biochimique pour les souches microbiennes.

Les épreuves biochimiques permettent en général de distinguer les espèces, même étroitement apparentées entre elles (TORTORA et *al*., 2003).

- **Système API 50 CH**

La galerie API 50 CH permet d'étudier le métabolisme des hydrates de carbone par les microorganismes .Elle est constituée de 50 microtubes comportant chacun une zone d'anaérobiose (le tube), pour les études de fermentation, et une zone d'aérobiose (la cupule) pour les études d'oxydation et d'assimilation. Le premier tube, sans substrat, sert de témoin négatif. Les tubes suivants contiennent chacun une quantité définie de substrat déshydraté, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques)

II.4_Production du biosurfactant :

Partie I : par les cellules libres :

II.4.1._ Micro-organisme et milieu de culture :

Les espèces bactériennes utilisées pour la production sont les souches isolée du sol, identifiée précédemment .ont été maintenus dans des boites de pétri contenant de l'Agar nutritif.Ils sont recultivés tous les mois et conservés à (4°C).

Pour la préparation de l'inoculum, 50 ml d'une préculture a été utilisée avec une concentration de 8 g/l.

La préculture contient (en g/l):

Extrait de carne .....3.

Peptone de gélatine .....5.

Avec pH = 6.8 ± 0.2

Les cultures croissent dans ce milieu pendent 18 h à température 25°C. Ce dernier été utilisé comme inoculum à 8 % (v/v) puis développé dans un milieu de culture minéral contenant (en g/l):

- Na_2HPO_4 (2.2), - $MgSO_4.7H_2O$ (0.06), - NaCl (0.05), $CaCl_2$ (0.02),
- KH_2PO_4 (1.4), - $FeSO_4 .7H_2O$ (0.01), - Extrait de levure (0.02),

On a 1 ml d'une solution d'oligoélément composés de (en mg/l):

- $ZnSO_4.H_2O$ (525), - $MnSO_4 .4H_2O$(200), - $CuSO_4.5H_2O$ (200),
- $NiSO_4.6H_2O$ (27), - $CoCl_2 .6H_2O$ (200), - H_3BO_3 (15).

Les bactéries ont été développés dans des earlenmeyers de 250ml ,(Figure 6) contenant 50ml de milieu de culture stérilisé par l'autoclave à (121C°, 1 atm) pendent 20 min. ils sont incubés 48 h sur un agitateur orbitale à 200 tr/min et à température 45 C°.



Figure 06 : incubateur shaker

II.4.2_Méthode analytique

II.4.2.1_Tension superficielle (γ)

La tension de surface est définie comme étant un état résultant des interactions s'exerçant entre les molécules à la surface d'un liquide au repos. Cette tension provient des forces intermoléculaires qui exercent une traction vers le bas sur les différentes molécules en surface.

La mesure de la tension superficielle est réalisée par la méthode de l'arrachement d'anneau en platine à l'aide d'un tensiomètre (figure 7).

Le milieu de production est centrifugé à 6000 tr/min pendant 20 min, afin de séparer la biomasse. Le surnageant séparé est le liquide employé pour mesurer la tension superficielle .Après l'incubation de notre production pendant 48 h.

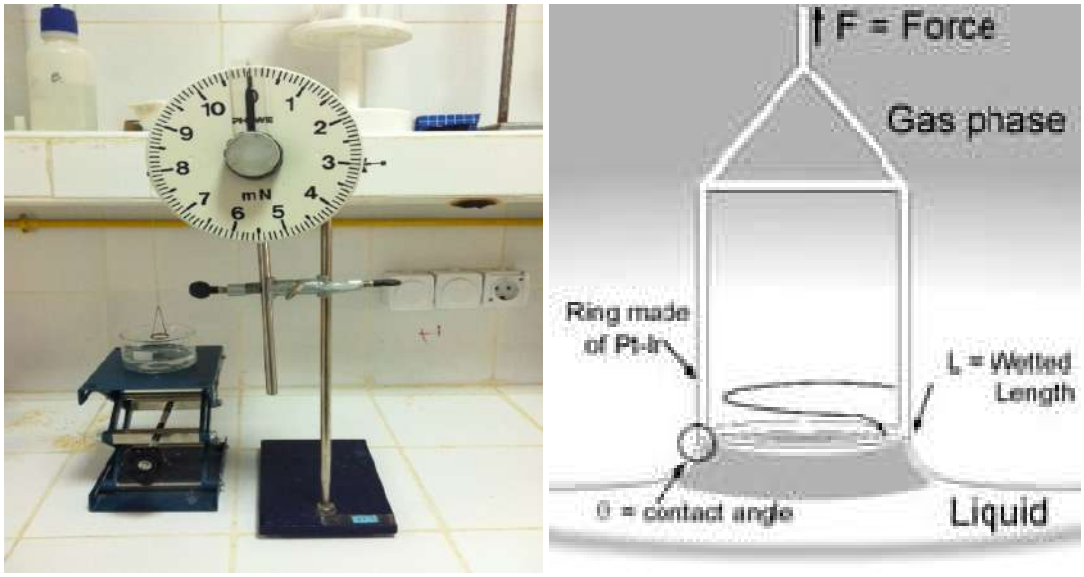


Figure 7 : Tensiomètre à anneau

II.4.2.2_Indice d'émulsification E_{24}

On détermine l'activité d'émulsification par la méthode de Cooper et Goldenberg, par lequel on met dans un tube a essai des volumes égaux de supernatant et un hydrocarbure (par exemple Kérosène) , et on mélange à l'aide d'un vortex à une vitesse maximale pendant 2 min.

La stabilité d'émulsion est déterminée après 24 h, et l'indice d'émulsification est calculé en division la longueur mesurée de la couche émulsionné par la longueur totale du mélange et en multipliant par 100.

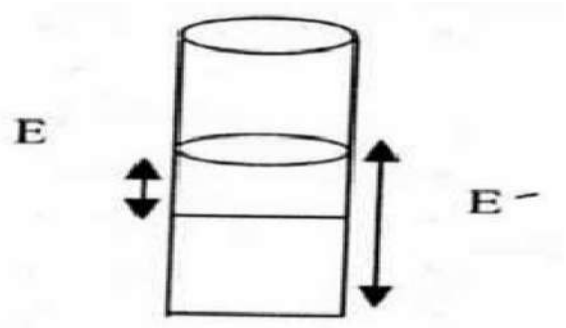


Figure 08 : Mesure du E_{24}.

Le calcul de l'indice E_{24} est donné par la relation suivante :

:

$$E_{24} = E / E'. 100\ (\%) \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots (1)$$

Avec E:la longueur de la couche émulsionnée.

E': la longueur totale du mélange.

II.4.3_Optimisation des paramètres opératoires :

Cette partie consiste à maximiser la quantité du biosurfactant produit en faisant varier trois paramètres : La source de carbone, la concentration de source de carbone , la source d'azote(0.02g/l).

II.4.3.1_Optimisation de source de carbone de biosurfactant

Deux facteurs intéressants ont été testés sur la production du biosurfactant : nature de la source de carbone et sa concentration. De ce fait, cinq sources de carbone ont utilisées (liquides hydrophobes insolubles dans l'eau) à une concentration de 2%: gasoil, pétrole, huile d'olive, Héxadécane, avec NH_4Cl (0.02g/l), comme source d'azote.

La sélection de la source optimale est basée sur la mesure de la TS et l'indice d'émulsification.

II.4.3.2_Optimisation de la concentration de source de carbone

Après qu'on a optimisé la meilleure source de carbone on passe à l'optimisation de sa concentration on prend les concentrations suivantes : 0.5%, 1%, 2%, 3% et on mesure la tension superficielle ainsi l'indice d'émulsification.

II.4.3.3_Optimisation de source d'azote

On ajoute aux milieux de cultures contenant la source de carbone optimale, les différentes sources d'azote à 0.02g/l : NH_4Cl, $NaNO_3$ et NH_4NO_3.

II.4.3.4_Optimisation de la concertation de source d'azote

Cette optimisation repose sur le choix de la concentration optimale pour avoir meilleur production de biosurfactant. Les concentrations prises sont : 0.01, 0.02 ,0.03 et 0.04 g/l.

II.5_Etude cinétique de la production dans un fermenteur par cellules libres

Une culture a été réalisée avec les conditions optimales de synthèse déterminées, dans le but de suivre des variations de la tension superficielle, l'indice d'émulsication, à différents intervalles de temps : 0, 6, 12, 24, 30, 36, 48, 54, 72 , 120 heures .

II.6_Extraction de biosurfactant

Le biosurfactant est précipité par acétone, en ajoutant au surnageant à trois volume égale d'acétone dans un bain marie glacé (figure 08), on laisse 24h à 4°C et on centrifuge (200tr/min).

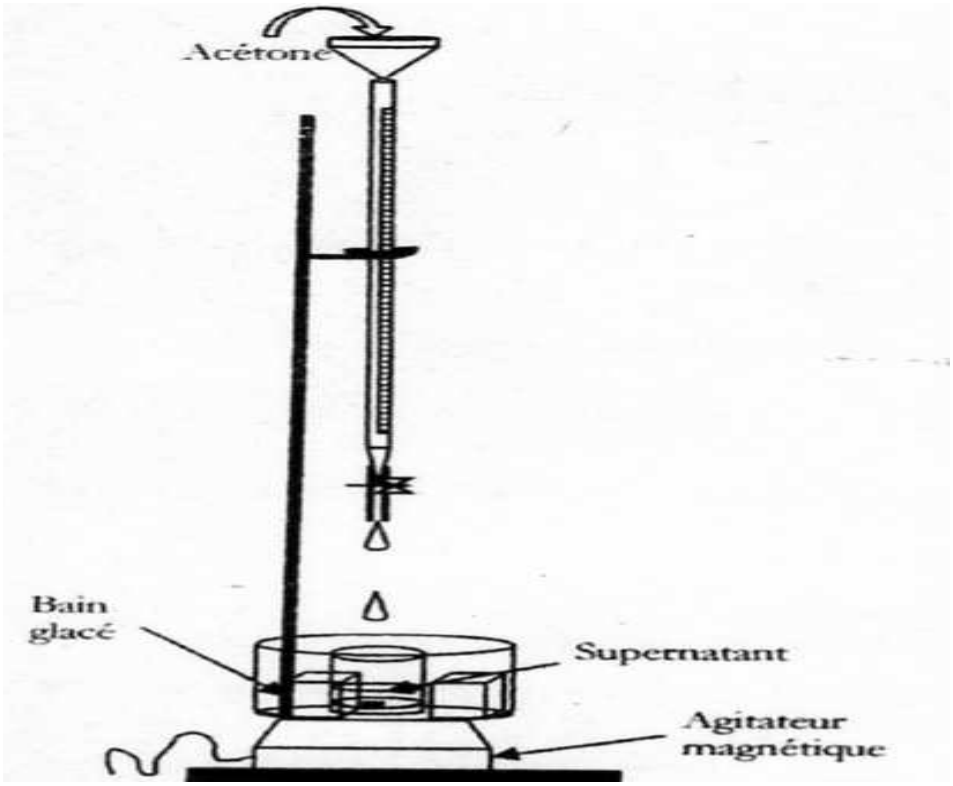


Figure 9 : Extraction de biosurfactant par l'acétone

Le biosurfactant obtenu est séché dans une étuve à 37 °C, Le rendement de production des biosurfactants a été également déterminé.

II.7_Caractérisation du biosurfactant

II.7.1_Caractérisation structurale

Spectre Infrarouge

En dissolvant une quantité du précipité dans le Bromure de potassium (KBr), puis la cellule contenant cette solution a été placée sur le trajet lumineux qui a une fréquence entre 500 et 4000 Cm^{-1}

II.7.2_Caractérisation physico-chimique

Stabilité thermique

Le supernatant a été incubé à différentes températures : 4,20, 45,70 et 100°C pendant 24min. La tension superficielle a été mesurée afin d'apprécier la stabilité thermique (Aboussaoud et al,2008)

Stabilité chimique

- **Effet du pH**

On varié le pH du supernatant de 2, à 6 puis à 8 et 11 en utilisant respectivement l'HCl et le NaOH, après de 24 h, à température ambiante on mesure la tension superficielle (Aboussaoud et al,2008)

- **Effet de la salinité**

Le chlorure de sodium (NaCl) a été ajouté aux échantillons du supernatant à Différentes concentrations différentes : 5, 10, 15, 50, 100 g/l..après repos de 24h à températures ambiante, on mesure la tension superficielle.

II.8_La concentration micellaire

CMC (concentration micellaire critique) est un paramètre important lors de l'évaluation de l'activité de bio-tensioactif. La tension superficielle de l'agent tensio-actif atteint sa valeur la plus basse à sa CMC. Au-dessus de cette concentration, aucun autre effet ne peut être observé sur l'activité de surface. La mesure de tension superficielle de solution biosurfactant dilué en série, la CMC a été déterminé en traçant la tension de surface par rapport à la concentration de bio-tensioactif dans la solution. (Yin, H. *et al*. , 2009).

II.9_Effet anti microbien

Les suspensions des espèces bactériennes: *Staphylococcus sp*, on été étalé sur l'agar. Un disque stérile (6mm) immergé dans une solution de biosurfactant jusqu'à la saturation a été déposé sur la surface de cet agar qui est incubé à 37°C pendantn24h.

La zone claire autour du disque obtenue indique l'activité inhibitrice contre l'espèce bactérienne cultivée.

Partie B:

II.10_Production par cellules immobilisées

II.10.1_Préparation des Cellules immobilisées

La procédure de l'immobilisation des cellules dans l'Alginate de calcium suit les étapes suivantes:

- Une préculture est lancée durant 48h puis elle est centrifugée.
- La biomasse obtenue est lavée avec le milieu de culture stérile.
- On centrifuge une deuxième fois, puis on redissout la biomasse dans un volume minimal de milieu de culture, cette solution est mélangée avec 100ml d'une solution stérile d'Alginate 4% (m/v), ensuite on ajoute graduellement au CaCl2 en solution par une seringue stérile , des billes d'Alginate sont formées.
- Une séparation des billes de la solution est réalisée par filtration.
- Les billes sont lavées avec l'eau distillée stérile, et stockées dans le milieu de culture à 4°C dans des flacons bien fermés.

La forme des billes d'alginate est représentée dans la figure où l'on remarque la présence de colonies de cellules immobilisée

II.10.2_La production par les cellules immobilisées

Sous les mêmes conditions optimales obtenues pour les cellules libres, une cultivation a été réalisée pour les cellules immobilisées dans l'Alginate de sodium. Puis on mesure la tension superficielle (γ), l'indice d'émulsification (E_{24}).

RÉSULTATS

ET

DISCUSSIONS

III. Les paramètres optimaux

III.1_ Effet de la source de carbone :

L'étape de l'optimisation a prouvé qu'il y a des conditions spécifiques pour produire le maximum de biosurfactant. Le bouillon de culture contenant Héxadécane et H-olive ont des tensions superficielles 34.95 et 34.82 mN/m respectivement la valeur est grande ce ci du à la quantité insuffisante de biosurfactant produite (figures 10.) et ayant la presque la même valeur de l'indice d'émulsification (figure 11) .

Dans le cas de pétrole une valeur de tension superficielle acceptable est obtenu 31.8 mN/m donc il y a une production de biosurfactant mais l'indice d'émulsification est le plus faible indice mesuré(figure 11), c'est du au a une quantité insuffisante de tension actif excrété pour atteindre la valeur de CMC pour former une bonne émulsion.

Enfin lorsque les bactéries se développent sur le gasoil, elles produisent une quantité Importante d'agent tensioactifs abaissent la tension superficielle du milieu jusqu' à 29.96 mN/m avec une émulsion stable d'indice d'émulsification E24 égale à 65%.

L'utilisation du gasoil avec une concentration de 2 % entraine une bonne réduction de la TS (29,96 mN/m) pour la souche bactérienne *K2N* (figure 10). D'après ces résultats, on a sélectionné le gasoil comme source de carbone optimale pour la souche *K2N.*

Tableau 5 : la tension superficielle des différentes sources du carbone

Source de carbone	Gasoil	Pétrole	Huile d'olive	Héxadécane
TS (mN /m)	29.96	31.58	34.82	34.95

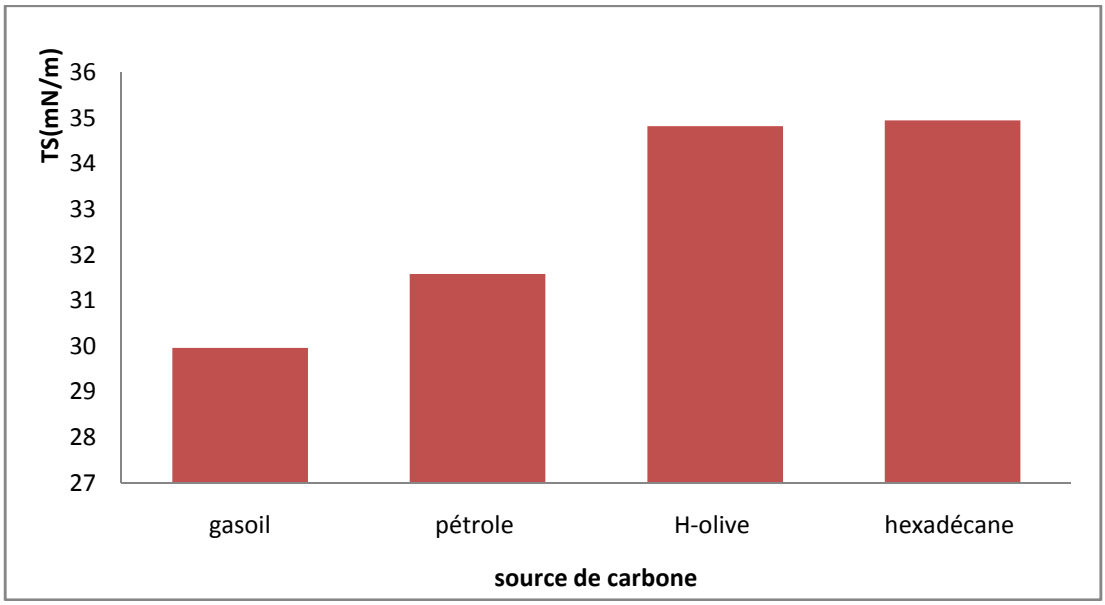


Figure10 **:** Influence de la source de carbone sur la production de biosurfactant

(source de carbone 1ml, T inc =45c°, agitation :200 tr /min, t=48h)

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

L'indice d'émulsification :

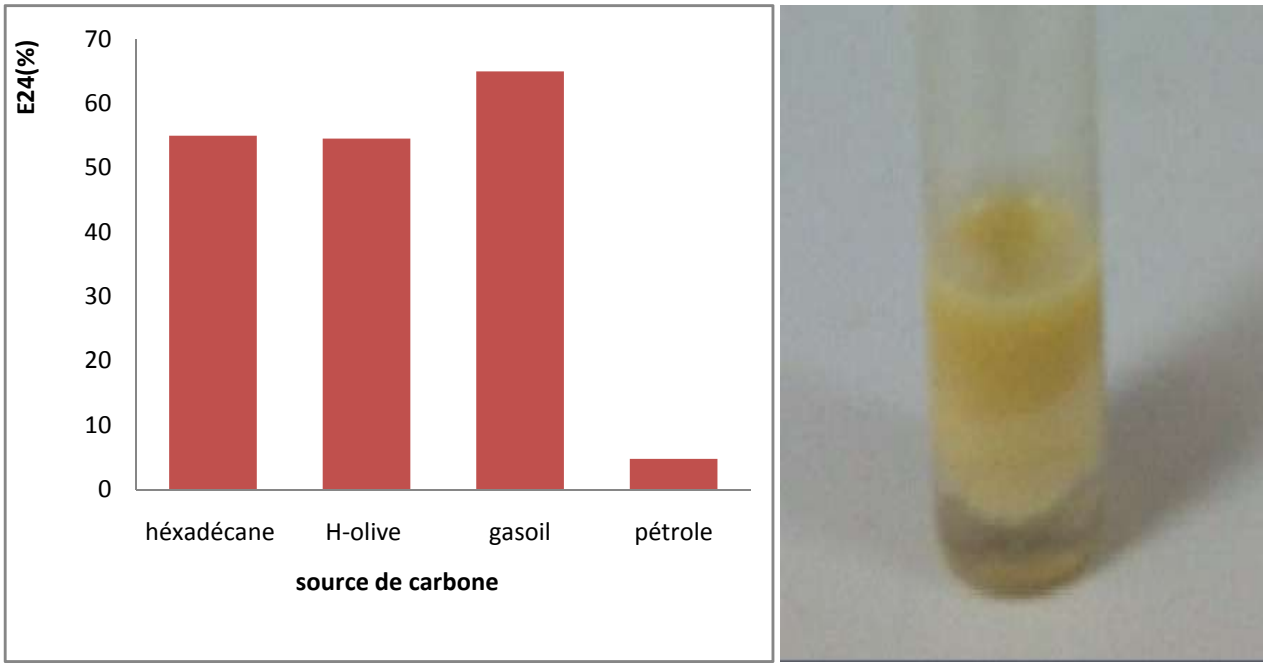


Figure11 : l'indice d'émulsification de la source de carbone avec l'huile de moteur .

III.2_Effet de la concentration de la source de carbone :

D'après les résultats obtenus, les faibles concentrations en substrat améliorent la production en biosurfactant. Par exemple,. En présence de la souche *K2N*, le gasoil a significativement abaissé la TS (27.94 mN/m) pour une concentration de 1 %. Donc, le biosurfactant produit par la souche *K2N* a montré un pouvoir exceptionnel de réduction de la tension superficielle,

Tableau 06 : la tension superficielle en fonction de la concentration du gasoil

Concentration de gasoil (%)	0.5	1	2	3
TS (mN/m)	33.2	27.94.	29.96	35.63

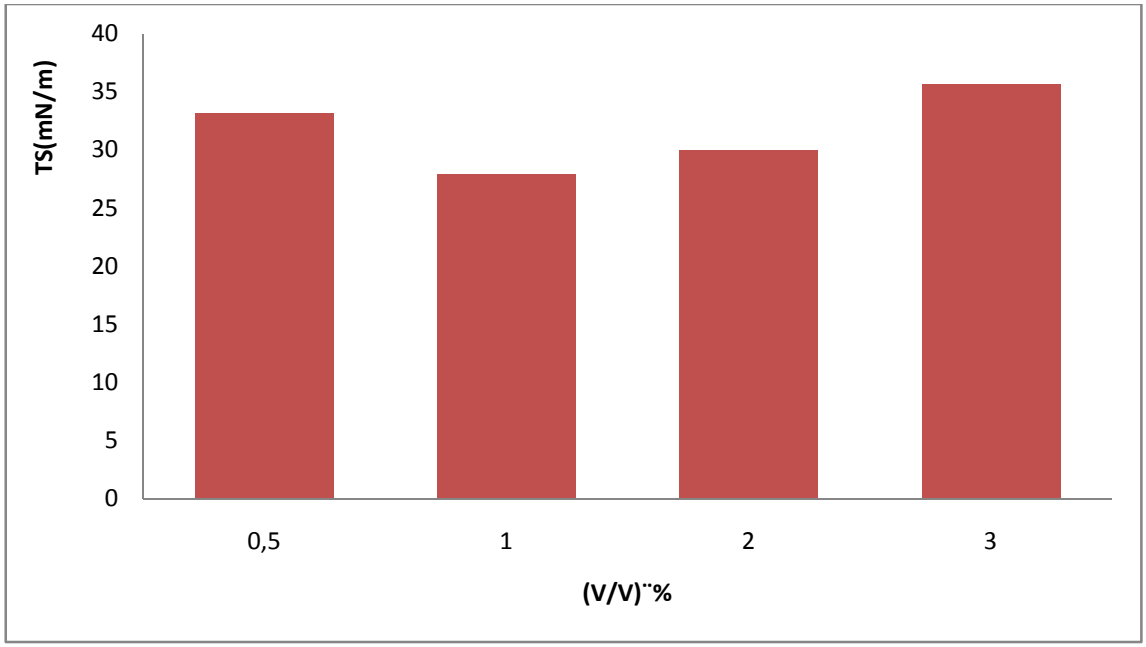


Figure12 : influence de concentration de gasoil sur la TS de *K2N*

(Source de carbone 0.5 ml, T_{inc}=45c°, agitation : 200tr / min, t=48h).

En conclusion, on peut dire que la nature et la concentration de la source de carbone jouent un rôle primordial dans l'amélioration de la production de biosurfactant traduit par la réduction de la tension de surface.

L'indice d'émulsification :

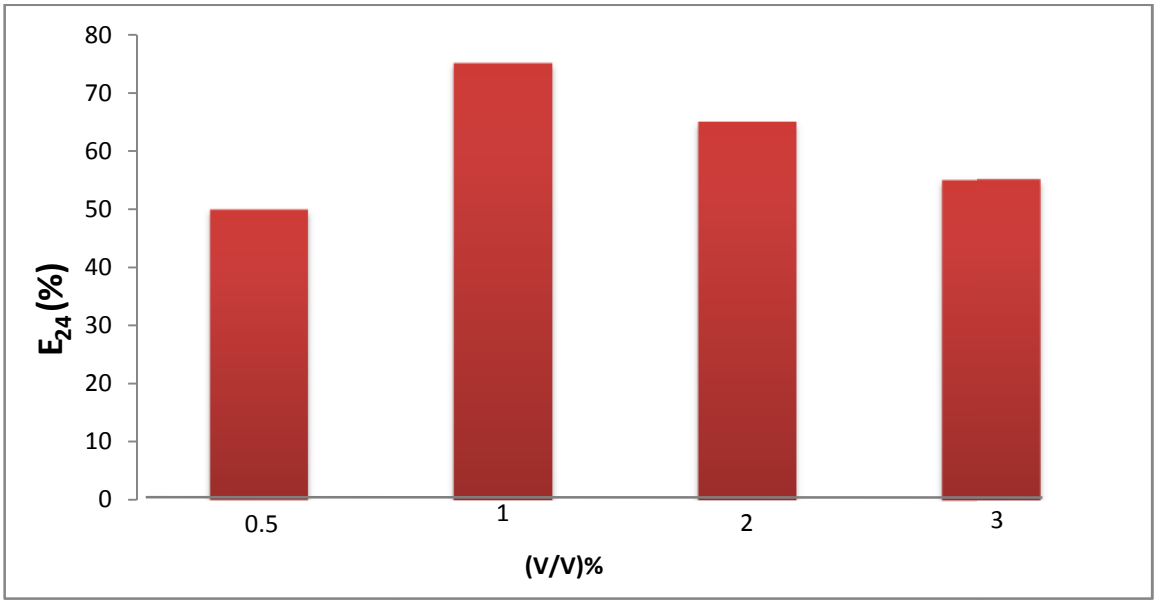


Figure 13: l'indice d'émulsification de différentes concentrations de gasoil

III.3 Optimisation de la source d'azote

Trois sources d'azote ont été utilisées : NH_4Cl, $NaNO_2$ et NH_4NO_3 à une concentration de 0.02g/l, avec la source de carbone optimale (gasoil). L'influence des différentes sources d'azote est montrée sur l'histogramme

Tableau07 : influence de la source d'azote sur la tension superficielle

Source d'azote	NH_4Cl	NH_4NO_3	$NNaO_2$
TS (mN/m)	28.59	30.77	31.58

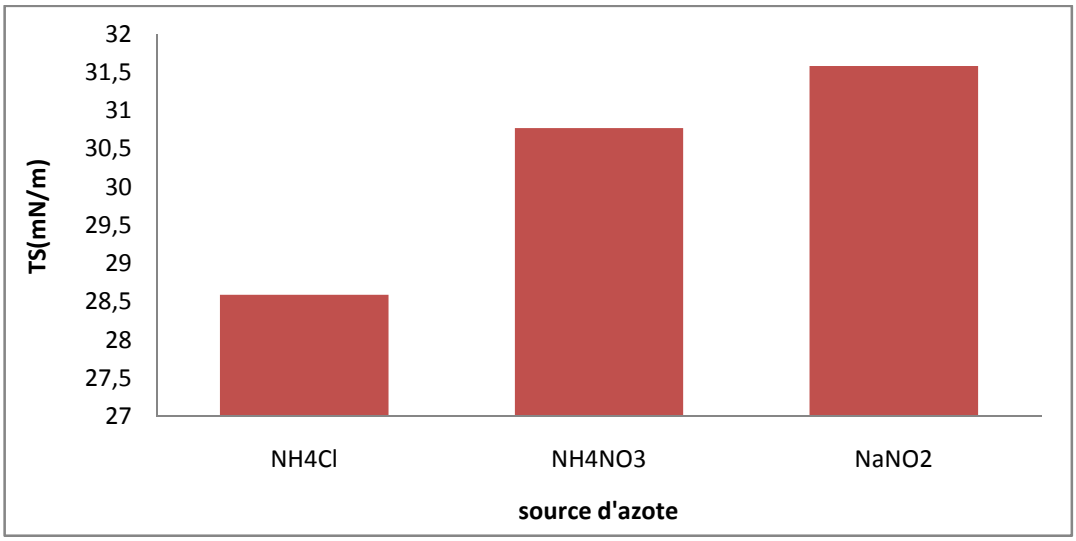


Figure 14 : Variation de La tension superficielle en fonction de la source d'azote

La figure14 montre que l'espèce *k2N* peut se développer sur les trois sources d'azote mais le chlorure d'ammonium est la source d'azote la plus efficace en comparaison avec le nitrate d'ammonium et nitrate de sodium

Comme a été représenté sur la figure(15,16) l'utilisation de chlorure d'ammonium a une conséquence une tension superficielle 28.59 mN/m avec un E24 de 68 % impliquent une meilleur productivité de biosurfactant que l'utilisation de nitrate d'ammonium et nitrate de sodium qui donnent des tension superficielles acceptables mais avec un indice d'émulsification 75% et 60% respectivement

L'indice d'émulsification de nitrate d'ammonium est plus grand que celle de chlorure Parce que le Les nitrates prennent un chemin métabolique conduisant à la production de métabolites secondaires provoquant l'instabilité des émulsions. En présence de $NH_4^{+,}$ la quantité du biosurfactant produite est plus importante et la concentration des métabolites secondaires produites par l'assimilation de NO_3^- est moins importante d'où l'on obtient une meilleure stabilité de l'émulsion. Un phénomène analogue a été observé avec la souche *pseudomonas putida ML2 (*Haba.E,et al.,2000).

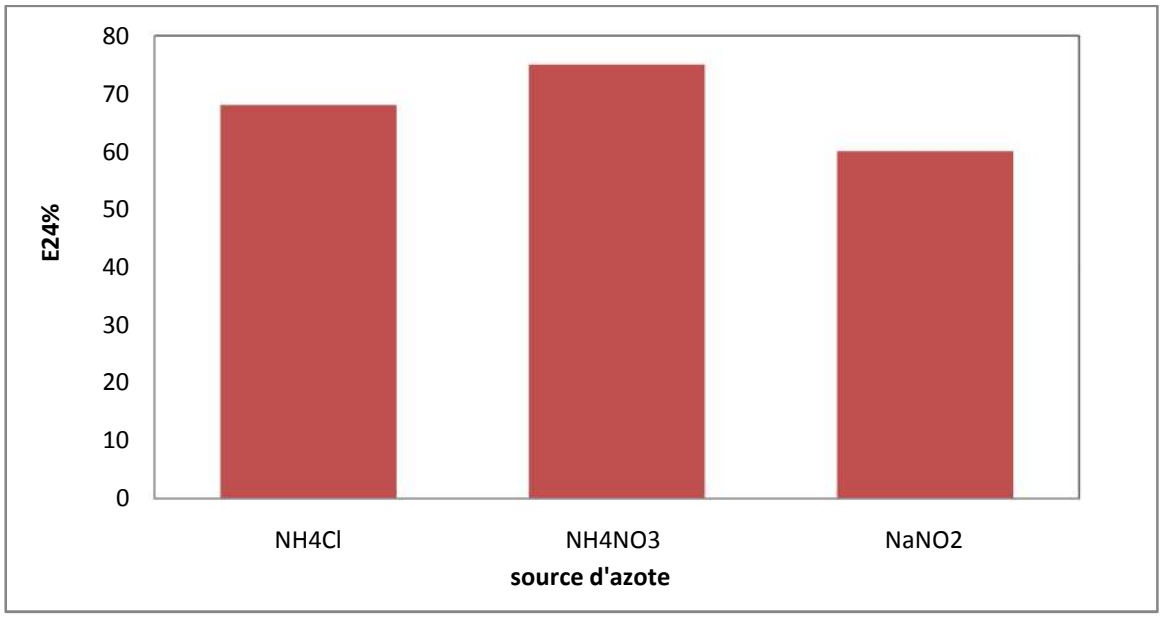


Figure 16: l'indice d'émulsification de la source d'azote

III.4 Optimisation de concentration de source d'azote

On obtient un rendements de production optimale, lorsqu'il y avait un excès de carbone dans le milieu dont l'azote était en quantité limitant (Lang et al . ,1999 ; Cameotra et al ., 1998, Desai.et al . ,1997)

Les concentrations choisies sont donnés les résultats suivantes :

La meilleur concentration qui nous donne une tension superficielle la plus basse et un indice d'émulsification le plus grand est de 0.02g/l (figure 16.17)

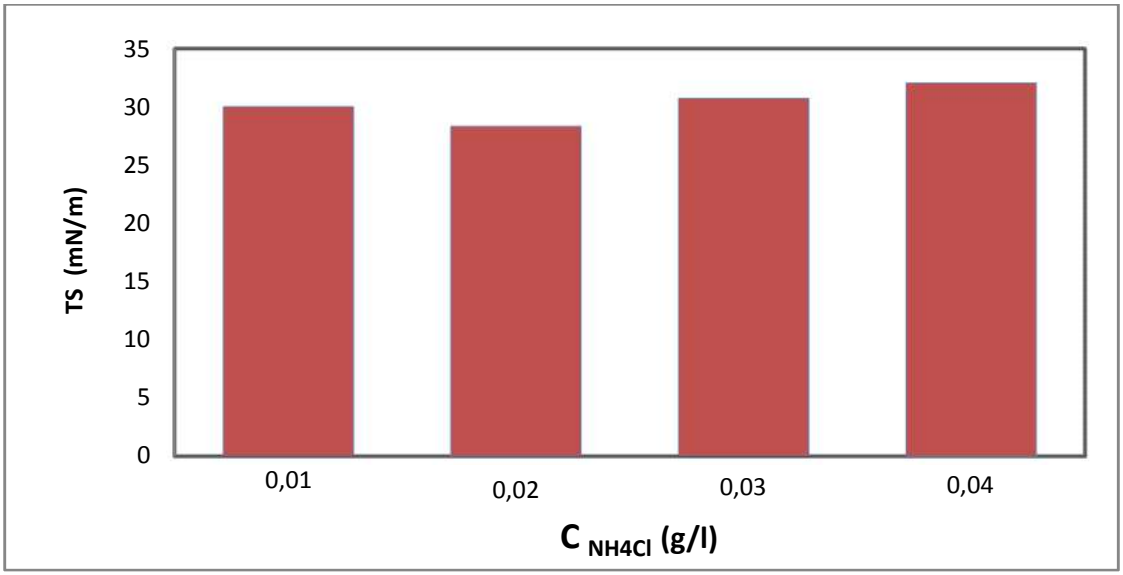


Figure 16 : optimisation de la concentration de source d'azote

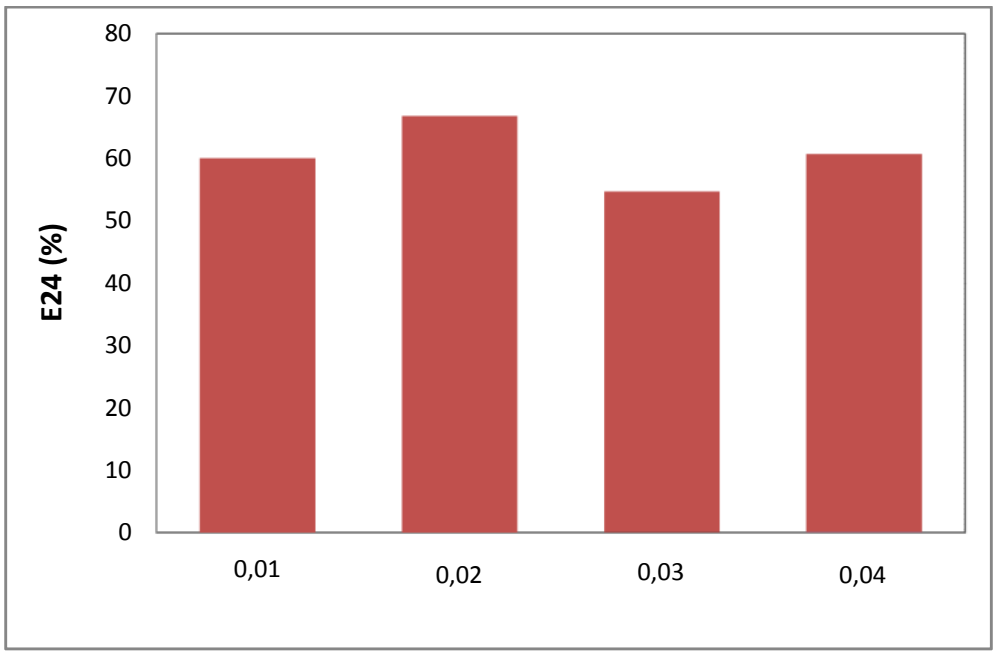


Figure 17: l'indice d'émulsification des différentes concentrations de NH_4Cl

III. 5_L'étude de la cinétique de production

La cinétique de synthèse a été suivie dans un milieu contenant gasoil comme source de carbone et NH4Cl .On a donc mesuré les réponses choisies pour la caractérisation du biosurfactant : γ , E24,tableau (09)

Dans les figures 15 on représente respectivement les variations de TS , E24

Tableau 09 : l'étude cinétique des cellules libres

Temps (h)	TS (mN/m)	E24(%)
0	**62,21**	**0**
6	47	0
12	44,54	4,5
24	36,5	40
33	33,78	59,6
48	29,8	65
72	43	35
120	46	7

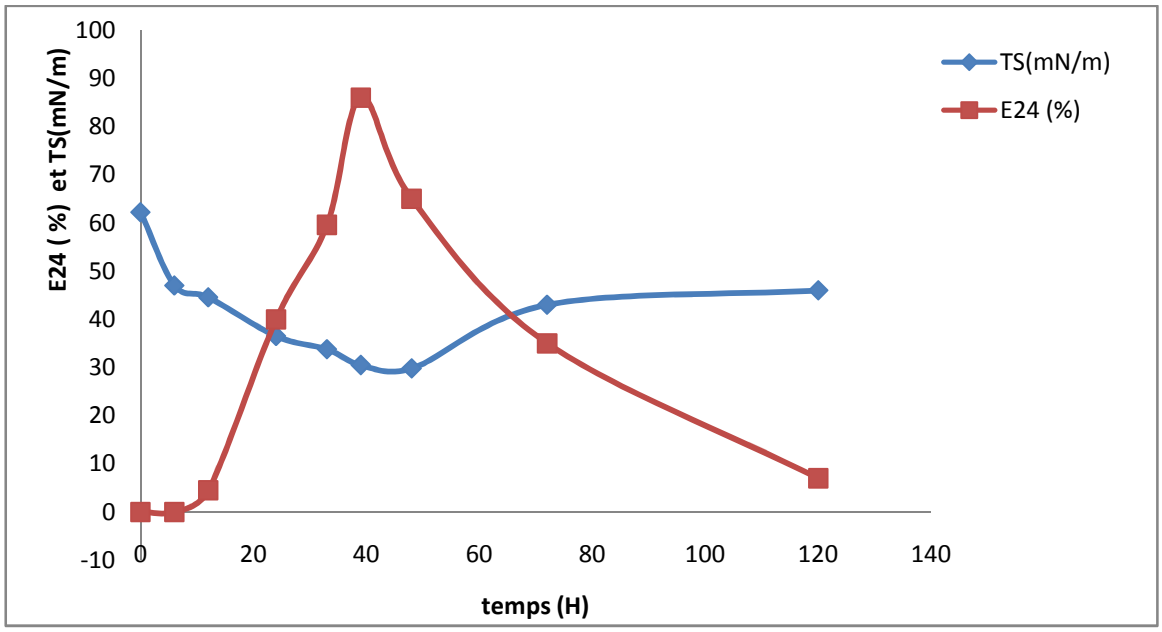


Figure 19 : Etude cinétique des cellules libres

La production du biosurfactant commence dès les premières heures d'incubation. ce qui signifie que la phase de latence de croissance est courte, grâce à la préculture qui donne un inoculum initial adapté important aux conditions optimales de fermentation favorisant la production.

La production du biosurfactant atteint son maximum au bout de 40h à 48h (29.8mN/m) de fermentation, l'indice d'émulsification atteint son maximum de 86% après 39 min, le temps nécessaire à la sécrétion d'une quantité suffisante de biosurfactant capable de former une émulsion stable mais on remarque la diminution de l'indice au bout de 48 est atteint 65%

Apres 48 h la tension superficielle va légèrement augmenter et indice d'émulsification

Ceci peut être du à deux a deux phénomène

- L'augmentation de la concentration des sous produits métabolites acides provoque la diminution de la concentration de biosurfactant lorsque la synthèse de ce dernier s'arrête
- Le biosurfactant produit devient une source nutritive, capable d'être dégradé par les microorganismes

Donc la production de l'agent tensio actif se fait dans la phase exceptionnelle

Alors la production de biosurfactant par *K2N* est une production associée à la croissance

III.6_Production par Cellules Immobilisées :

Après une incubation dans les mêmes conditions que les cellules libres on a obtenue les résultats suivante :

Pour la tension superficielle : 31.63 mN/m avec un indice d'émulsification qui égale à 75%

on remarque l'obtention de bonne tension superficielle avec une petite différence avec celle obtenu par cellule libre.



Figure19 : les billes de cellules immobilisées au cours de filtration

III.7_L'étude de la cinétique de production de cellules immobilisées :

La figure(20) montre qu'après 72h, la tension superficielle (γ) atteint la valeur Minimale (31.58 dyn/cm) contrairement au cas des cellules libres ou l'on a observé l'augmentation de après 48h.

Ce qui démontre que la production de métabolites secondaires peut altérer la production du biosurfactant, dans le cas des cellules immobilisées est limitée et qu'il y a un changement dans la physiologie cellulaire suite à la fixation sur le support dans les conditions optimales.

Le retard accumulé pour la production d'une quantité suffisante de biosurfactant en Comparaison avec les cellules libres est due aux limitations diffusionnelles des éléments Nutritifs et de l'oxygène à l'intérieur des billes d'alginate et du biosurfactant diffusant vers L'extérieur (Norton et al .,1994)

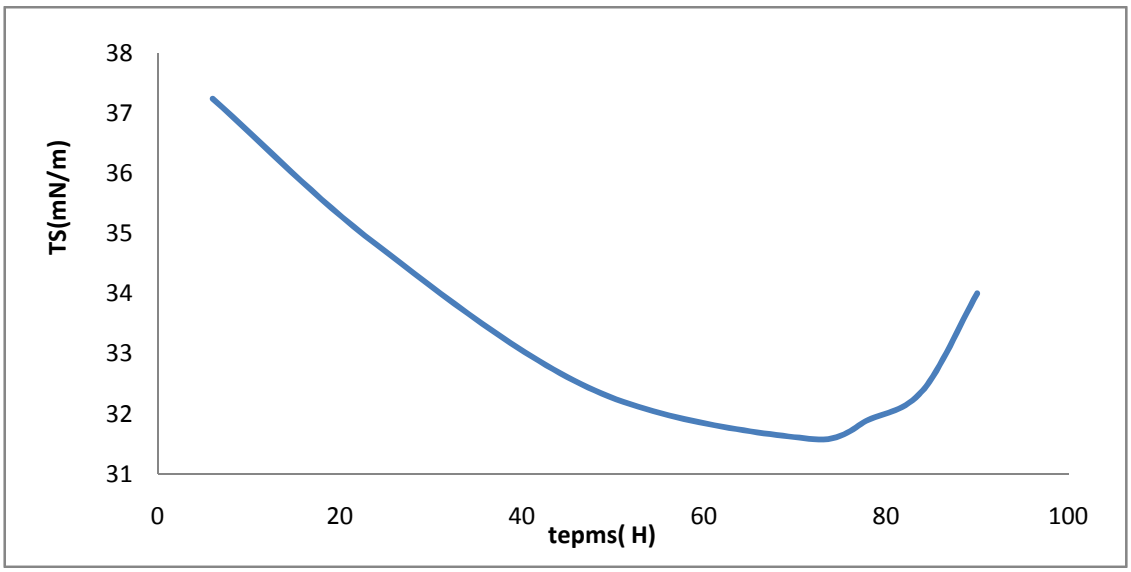


Figure 20 : la cinétique des cellules immobilisées

Tableau 10: Comparaison des caractéristiques du biosurfactant obtenu par cellules libres et immobilisées

	γ (mN/m)	E_{24} (%)
Cellules libres	27.94	68
Cellules immobilisées	31.63	75

III.8_Extraction de biosurfactant :

La méthode de séparation a donné un rendement de 1.5g /l de biosurfactant. Le précipité obtenu est une poudre blanche cristalline soluble dans l'eau distillée.

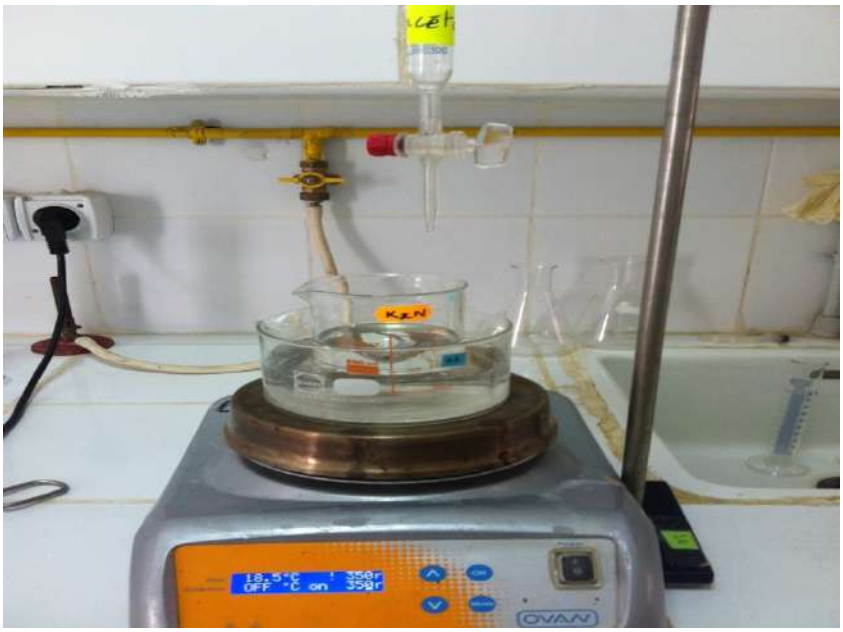


Figure 20: Mécanisme d'extraction de biosurfactant par acétone

III.9_Caractérisation de biosurfactant :

Spectre infrarouge

Le spectre IR du biosurfactant solide ou en solution a été mesuré à l'aide d'un Spectrophotomètre HEWLETT Packard entre 500 et 4000 cm-1.

Le spectre donne l'absorbance (A) en fonction du nombre d'onde (y).

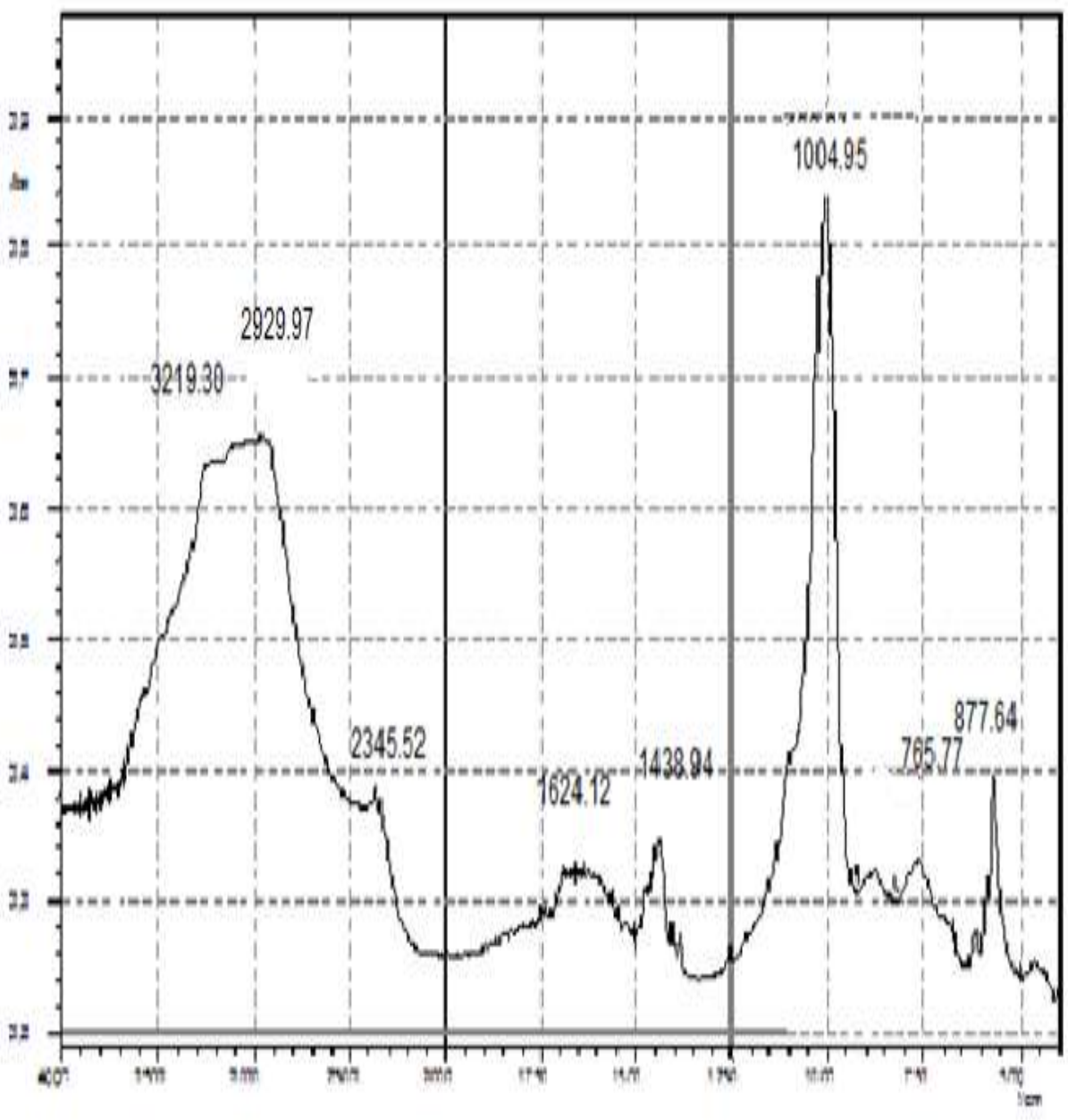


Figure 22 : Spectre FTIR du biosurfactant produit par la souche *K2N*

Tableau 11 : Groupements caractéristiques du biosurfactant

La bande	Liaison
3219.30 cm^{-1}	N-H
2929.97 cm^{-}	-CH_2- ou -CH_3 (alcane)
1004.95 cm^{-1}	C-N

D'après, yakimov et al .,2000 La souche de *Bacillus. Licheniformis* produit un lipopeptides : les lichenysines. Sa une structure de base identique à celle des surfactines, elles diffèrent de celles-ci par le résidu glutaminyle en position 1

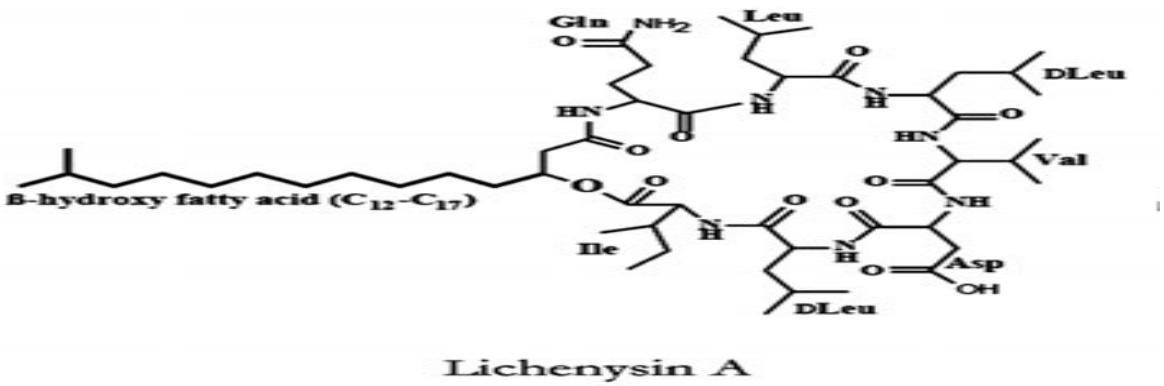


Figure 23: la structure primaire de lichenysine A(yakimov et al .,2000)

en comparant l'étude de yakimov et al .,2000 avec nos résultats on constate que le biosurfactant produit par notre souche bactérienne correspond au: lichenysine. A

III.10_Etude de stabilité du biosurfactant :

L'application industrielle du biosurfactant dépend de sa stabilité aux différentes variables telles que le pH, la température et le degré de la salinité.

Stabilité chimique

Effet du pH

Selon les résultats obtenus (figure24), le biosurfactant montre une stabilité aux changements de pH de 2 à 12. A titre d'exemple les valeurs de la tension superficielles aux pH : 2, 4 et 6, sont 31.58, 31.4et 28.15. mN/m respectivement. Ces résultats obtenus montrent l'intérêt de son application des les milieux acido-basiques.

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

Le pH optimal pour la croissance et la production de bio-tensioactif a été déterminée comme étant de 6

Résultat similaire a été observé par la production de bactéries biosurfactant P.aeruginosa MR01 par Lotfabada et al 2009 (L. Rodrigues,et al 2006, Kokare, et al,2007)

En variant le pH de 2 à 12, le biosurfactant produit par la souche *Staphylococcus haemolyticus* 1E garde son activité tensioactive (30 – 31,5 mN/m) (Eddouaouda *el al*., 2012). Egalement, les travaux réalisés par Danyelle *et al.* (2013) ont monté que le biosurfactant issu de la souche *Candida lipolytica* présente une bonne résistance (TS = 33,8 mN/m) dans les milieux acides (pH = 2), cependant une légère augmentation de la TS (35,1 mN/m) a été enregistrée dans les milieux alcalins (pH = 12)

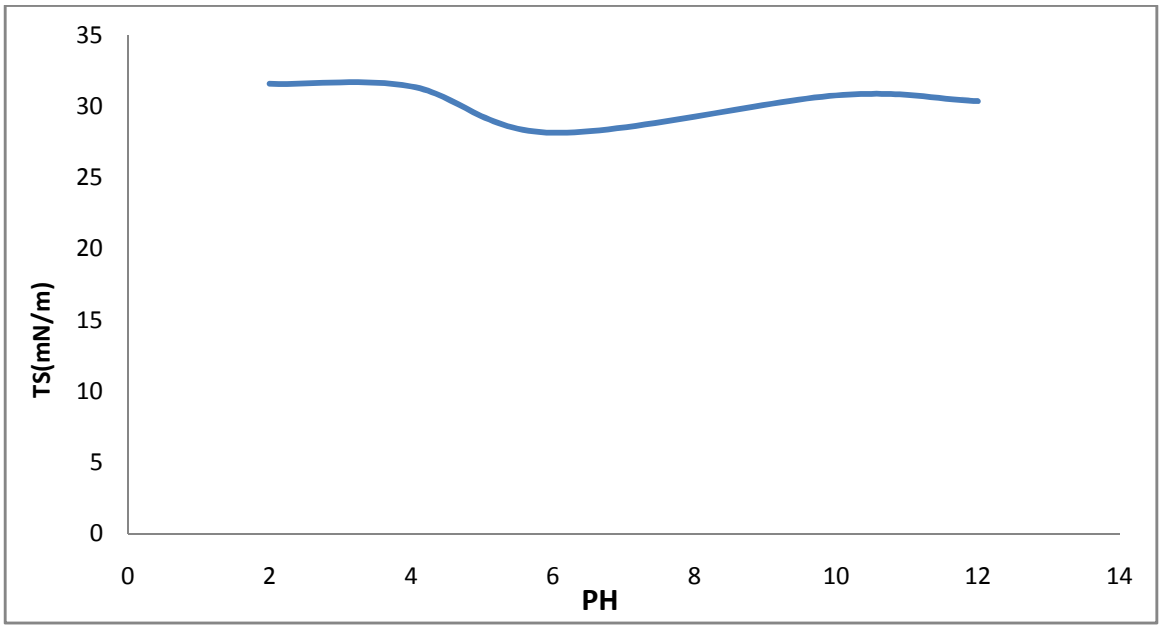


Figure 24 : Influence de la variation du pH sur la stabilité du biosurfactant de K2N

Effet de température

Selon les résultats présentés dans la figure 25, nous avons observé que le biosurfactant présente une excellente stabilité dans la gamme de température variant de 20 à 100 °C. Dans cette gamme, la TS reste presque constante .Notons que les eaux froides (4 °C) augmentent la TS de la solution en biosurfactant de K2N jusqu'à34.82 mN/m. Cependant, à cette valeur de TS et d'après la littérature le biosurfactant est considéré efficace. Donc,

on peut dire que ce biosurfactant maintient ses propriétés tensioactives dans la gamme de température de 20 à 100 °C.

Le changement de la tension superficielle suite au traitement thermique ne dépasse pas 3 mN/m

Les résultats obtenus par Brown (1999) indiquent que l'exposition de biosurfactant, produit par une souche bactérienne (désignée par isolat 1165), à des températures extrêmes [0, 4, 100 et 120 °C] n'affecte pas la stabilité thermique de biosurfactant. D'autre part, Makkar et Cameotra (2002) ont observé que la tension de surface conserve sa stabilité après l'exposition de biosurfactant produit par la souche *Bacillus subtilis* à une température de 100 °C. Egalement, Khopade *et al*. (2102) ont trouvé que le biosurfactant issu de la *Nocardiopsis sp.* B4 a montré une résistance aux températures élevées (jusqu'à 100 °C).

Thermo tolérants bactéries ont l'avantage qu'elles peuvent être cultivées dans des conditions où les autres micro-organismes ne peuvent se développer, ce qui réduit le risque de contamination.

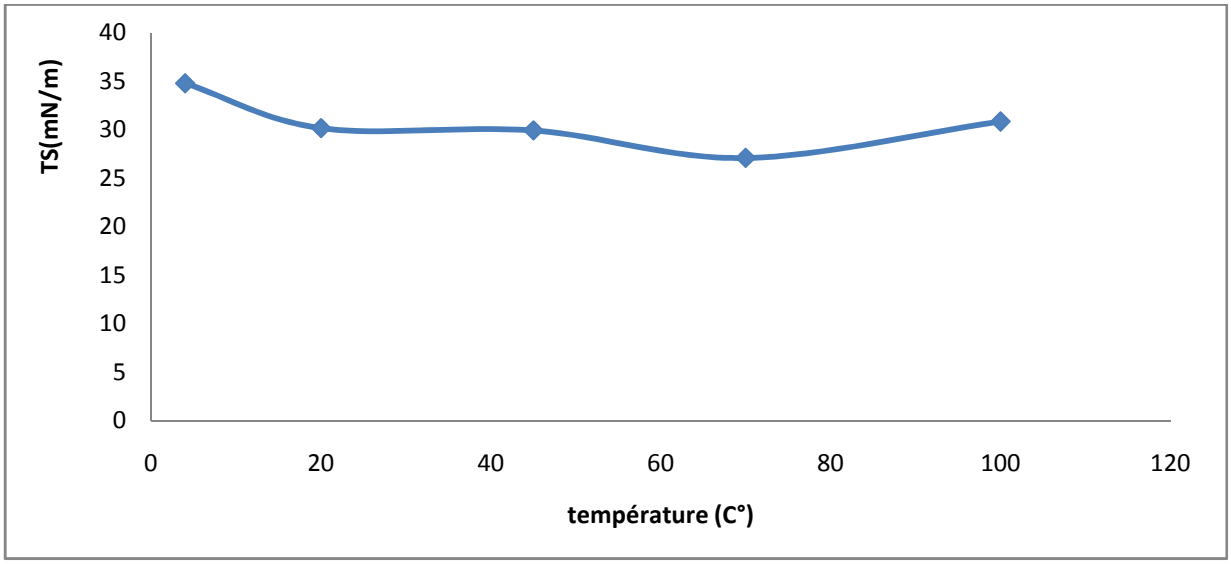


Figure 25 : Influence de la variation de la température sur la stabilité du biosurfactant

Stabilité chimique

Effet de la salinité

Le biosurfactant de la souche *K2N* montre une stabilité remarquable dans les milieux salés, dont la salinité allant jusqu'à 50 g/l. Au delà, une légère diminution de la TS a été

observée. Cependant, la différence entre les valeurs de la tension de surface ne dépasse pas les 2 mN/m dans la gamme de la salinité étudiée. La tension de surface minimale enregistrée était de 28.51.mN/m comme le montre la figure 26.

Selon Desai et Banat (1997), des concentrations en sel supérieurs à 2% sont suffisantes pour inactiver les tensio-actifs synthétiques.

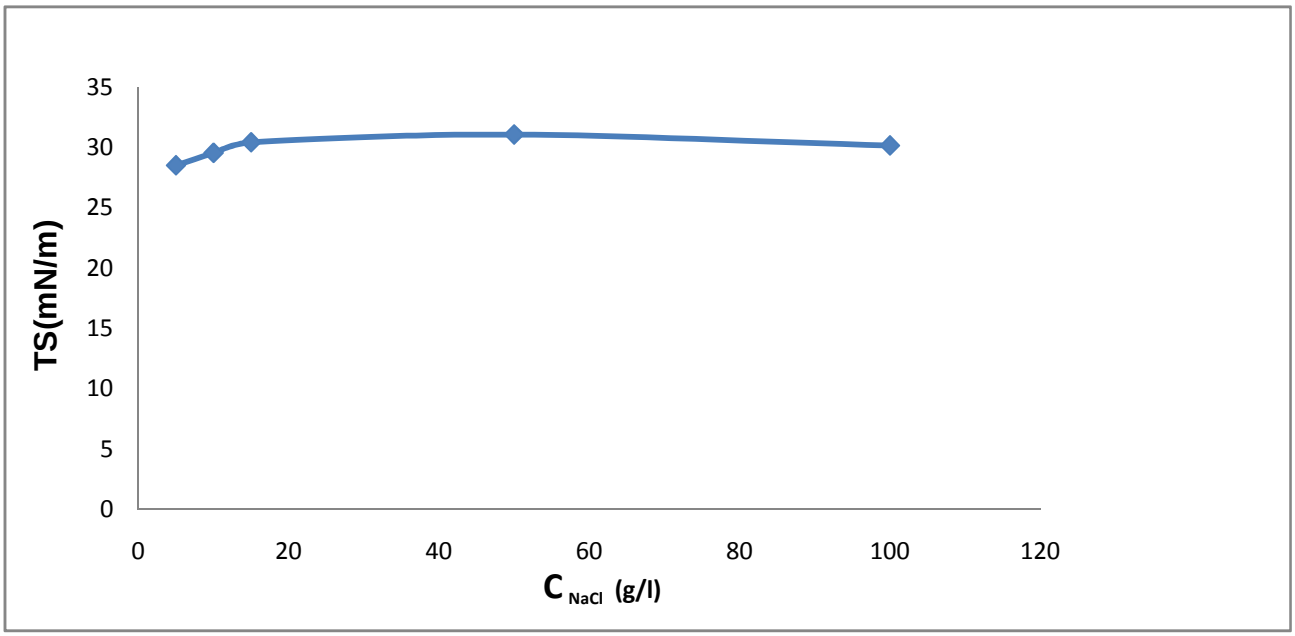


Figure 26: influence de la salinité sur la stabilité de biosurfctant

Cette bactérie a été classée comme halotolérante.

La tolérance au sel est une stratégie cellulaires d'adaptation un niveau osmotiques physiologique et moléculaire pour lutter contre la salinité fluctuante (Plemenitas et al. 2008).

III.11_Concentration Micellaire Critique (CMC) du biosurfactant :

Le tableau 12 indique les résultats obtenus sur la variation de la tension superficielle en fonction de la concentration du biosurfactant

Tableau 12 : Variation de la tension superficielle en fonction de la concentration du biosurfactant

C(mg/l)	0.156	0.312	0.625	1.25	2.5	5
TS(mN/m)	37.25	34.82	32.39	29.56	28.34	29.15

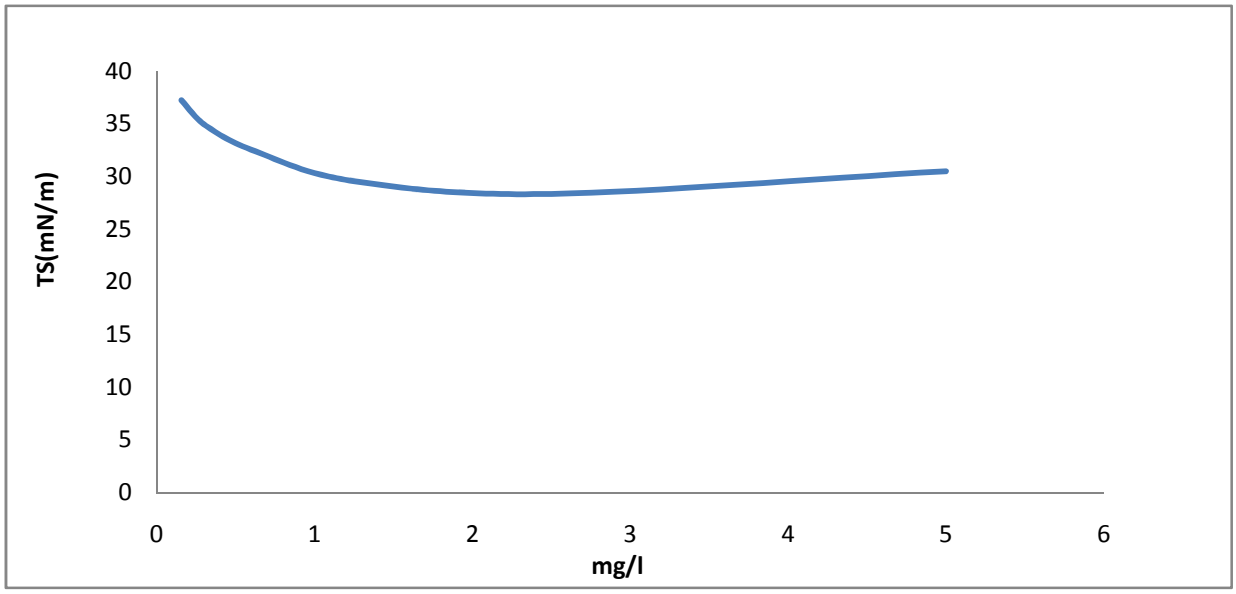


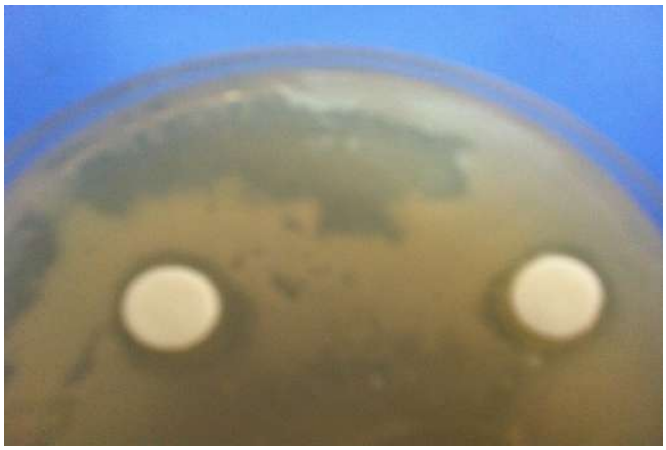
Figure 27: Tension superficielle en fonction de la concentration en biosurfactant

La figure 27 représente la tension superficielle en fonction de la concentration en biosurfactant. Cette figure montre que la tension superficielle décroît de manière exponentielle, jusqu'à atteindre un minimum proche de 28.34 mN/m, pour une concentration en biosurfactant supérieur ou égale à 2.5 mg/l.

III.12 Test anti microbien (test d'inhibitions**) :**

Après 24 h incubation, le biosurfactant produit par les espèces des *Bacillus Licheniformis* montre un pouvoir inhibiteur contre l'espèce bactérienne indicé

La figure (a) montre une croissance et l'apparition d'une zone claire qui entoure le disque de papier qui a été immergé dans la solution concentré de biosurfactant



III.12_Identification de la souche bactérienne K2N

III.12.1_Caractères macromorphologiques :

Les caractères macroscopiques de la souche *K2N* sont regroupés dans le tableau 6.

Tableau 13**:** Caractères macroscopique de la colonie isolée à partir de la souche *K2N* sur le gélose nutritive

Souche / Critères	K2N
Diamètre	2 mm
Chromogènes	Blanc jaunâtre
Forme	Circulaire
Elévation	Bombée
Contour	Régulier
Surface	Granulaire
Consistance	Crémeuse

III.12.2_Caractères micro morphologiques :

D'après nos observations, il ressort que la bactérie isolée de la souche *K2N* est mobile et à GRAM positif, sa forme est de coccobacille. Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 4.

Critères / Souche	**Après Coloration de GRAM**		
	Forme	**Gram**	**Mobilité**
K2N	Coccobacilles	Positif	Mobile

L'observation microscopique a été réalisée après la coloration de Gram, elle est visualisée sur la figure 28.



Figure 28 : Aspect microscopique de la souche *K2N* (microscope optique, ×100)

III.10.3_Résultats des tests biochimiques :

Les résultats des tests biochimiques sont représentés dans le tableau 6.

Tableau 14: Résultats des tests biochimiques après lecture de l'API CH 50

	Abréviations	**Sucre**	**Après 48 h**		**Abréviations**	**Sucre**	**Après 48 h**
0	0	Témoin	Négatif	31	SAC	D-Saccharose	Positif
1	GLY	Glycérol	Positif	32	TRE	D-Tréhalose	Positif
2	ERY	Erythritol	Négatif	33	INU	Inuline	Négatif
3	DARA	D-Arabinose	Négatif	34	MLZ	D-Mélézitose	Négatif
4	LARA	L-Arabinose	Positif	35	RAF	D-Raffinose	Négatif
5	RIB	D-Ribose	Positif	36	AMD	Amidon	Positif
6	DXYL	D-Xylose	Positif	37	GLYG	Glycogène	Positif
7	LXYL	L-Xylose	Négatif	38	XLT	Xylitol	Négatif
8	ADO	D-Adonitol	Négatif	39	GEN	Gentiobiose	Positif
9	MDX	Méthyl-ßD-Xylopyranoside	Négatif	40	TUR	D-Turanose	Positif
10	GAL	D-Galactose	Positif	41	LYX	D-Lyxose	Négatif
11	GLU	D-Glucose	Positif	42	TAG	D-Tagatose	Positif
12	FRU	D-Fructose	Positif	43	DFUC	D-Fucose	Négatif
13	MNE	D-Mannose	Positif	44	LFUC	L-Fucose	Négatif
14	SBE	L-Sorbose	Négatif	45	DARL	D-Arabitol	Négatif
15	RHA	L-Rhamnose	Négatif	46	LARL	L-Arabitol	Négatif
16	DUL	Dulcitol	Négatif	47	GNT	Potassium Gluconate	Positif
17	INO	Inositol	Négatif	48	2KG	Potassium 2-CétoGluconate	Négatif
18	MAN	D-Mannitol	Positif	49	5KG	Potassium 5-CétoGluconate	Négatif

19	SOR	D-Sorbitol	Positif	31	SAC	D-Saccharose	Positif
20	MDM	Méthyl-αD-Mannopyranoside	Négatif	32	TRE	D-Tréhalose	Positif
21	MDG	Méthyl-αD-Glucopyranoside	Positif	33	INU	Inuline	Négatif
22	NAG	AcétylGlucosamine	Positif	34	MLZ	D-Mélézitose	Négatif
23	AMY	Amygdaline	Positif	35	RAF	D-Raffinose	Négatif
24	ARB	Arbutine	Positif	36	AMD	Amidon	Positif
25	ESC	Esculine	Positif	37	GLYG	Glycogène	Positif
26	SAL	Salicine	Positif	38	XLT	Xylitol	Négatif
27	CEL	D-Cellobiose	Positif	39	GEN	Gentiobiose	Positif
28	MAL	D-Maltose	Positif	40	TUR	D-Turanose	Positif
29	LAC	D-Lactose	Négatif	41	LYX	D-Lyxose	Négatif
30	MEL	D-Melibiose	Négatif	42	TAG	D-Tagatose	Positif

Selon la morphologie macroscopique et microscopique, les caractères biochimiques de la souche bactérienne K2N, et surtout selon le tableau d'identification de la galerie biochimique API CH 50, la souche bactérienne thermophile **K2N** a été affilée à l'espèce ***Bacillus Licheniformis.*** Les figures 29 montre les tests biochimiques par la galerie biochimique API 50.



Figure 29 : Résultat de la galerie biochimique Api 50 CH

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif de ce travail était de synthétiser, de caractériser un composé tensioactif d'origine bactérienne.

L'intérêt est porté en premier lieu à la production d'un biosurfactant à partir de la souche***K2N*** .sous forme de cellules libres

l'identification phénotypique (Api 50 CH) de la souche performante montre que la souche bactérienne thermophile K2N est affilée à l'espèce ***Bacillus licheniform*mis**

Cette étude a été réalisée sur des cultures en batch, en utilisant différentes méthodes physico-chimiques pour mettre en évidence indirectement la production du biosurfactant. On a utilisé comme techniques : la mesure de la tension superficielle, l'indice d'émulsification, ont montré une capacité productrice de biosurfactant remarquable traduit par la faible valeur de la tension de surface. La source de carbone le gasoil (1%) et nitrate de chlore (NH_4Cl) 0.02 g comme source d'azote, donne une bonne production de biosurfactant en présence de la souche ***Bacillus licheniform*mis** (27.94 mN/m).

La cinétique de dégradation de production maximale du biosurfactant a été obtenue au niveau 48 h de avec une tension superficielle minimale de 29.8 (mN/m) et un indice d'émulsification égale à 68%.

Le biosurfactant a été caractérisé par des méthodes physico-chimique, qui a montré que la souche ***Bacillus Licheniformis*** est thermorésistante et le biosurfactant est stable thermiquement dans une large gamme de température [20 à 100 °C],

Aussi elle est halotolérant et le biosurfactant produit peut supporter des degré élevée de la salinité atteint jusqu'à 100 g/L

La caractérisation chimique montre que le pH n'a aucune influence sur la stabilité Identification par l'infrarouge montre que notre biosurfactant appartient au lipoprotéine lichenysine A avec une concentration égale 2.5mg /l

Dans la seconde partie de l'étude, la production du biosurfactant a été réalisée, par cellules immobilisées de ***Bacillus Licheniformis*** en utilisant les facteurs optimaux de la production obtenus dans la partie des cellules immobilisés

La cinétique de production du biosurfactant a montré que la production maximale a été obtenue après 72 h à 45C avec une tension superficielle minimale de 31.mN /m

REFERENCES

ABALOS A., PINAZO A., INFANTE M.R., CASALS M., GARCIA F. et MANRESA A., **(2001),** Physicochemical and Antimicrobial Properties of New Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from Soybean Oil Refinery Wastes, *Langmuir,* **17**, (5), 1367-1371.

Abouseouda , M., R. Maach , A. Amranec, S. Bouderguaa and A. Nabi, (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens.* Desalination, 223: 143-151.

ARINO S., MARCHAL R. et VANDECASTEELE J.P., (1996). Identification and production of rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45 : 162-168.*

banat, I.M. (1995.) Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. Biores . Technol. 51 : 1-12.

Banat, I.M., B.S. Makkar and S.S. Cameotra, 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. Applied Microbiol. Biotechnol., 53: 495-508**.**

Bognolo, G. 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloid. Surf. A.. 152 : 41-52.

Brown (1999) Brown M. J. (1991). Biosurfactants for cosmetic applications, *International Journal of Cosmetic Science*, 13, (1991), 61 - 64.

Desai, JD, Banat, IM (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Molecular Biol. Rev., 61:47-64.

Chibata, i., T. Tosa et T. Sato. 1986. Methods of cell irnmobilization. Dans Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Éds. ASM**.** Washington, États-unis. pp. 2 17-228.

Chibata, L, et T. Tosa. 198 1. Use of immobilized cells. Annual Revision of Biophysics and Bioengineering 10: 197-2 16.'

(Christofi et Ivshina,).2002. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation

Danyelle K. F. Santos, Raquel D. Rufino, Juliana M. Luna,Valdemir A. Santos, Alexandra A. Salgueiro, Leonie A. Sarubbo (2013). Synthesis and evaluation of biosurfactant produced by *Candida lipolytica* using animal fat and corn steep liquor Journal of Petroleum Science and Engineering, 105. 43–50

Desai, JD, Banat, IM (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiol. Molecular Biol. Rev., 61:47-64.

DESCHENES L., LAFRANCE P., VILLENEUVE J.-P. et SAMSON R., (1996). Adding sodium dodecyl sulfate and Pseudomonas aeruginosa UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 46 : 638-646.

Eddouaouda kamal (2012). Etude du potentiel biodégradatif de souches isolées du sol de Hassi-Messaoud contaminé par du pétrole : Criblage, biodégradation de HAp et production de biosurfactant. Thèse de Doctorat, Université Saad Dahlab-Blida. 210p

Edwards K.R., Lepo J.E., Lewis M.A, **(2003)** Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species Mar. Pollut.Bull. 46, 1309-1316,

Ferhat samira, Sami Mnif, Abdelmalek Badis, Kamel Eddouaouda, Redha Alouaoui, Ahmed Boucherit, Najla Mhirib, Nadji Moulai-Mostefa, Sami Sayadi (2011). Screening and preliminary characterization of biosurfactants produced by Ochrobactrum sp. 1C and Brevibacterium sp. 7G isolated from hydrocarbon-contaminated soils. International Biodeterioration & Biodegradation 65, pp.1182 – 88. **)**

Fiechter, A., 1992. Integrated systems for biosurfactant synthesis. Pure Applied Chem., 64: 1739-1743

GABET S., (2004). Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. *Thèse de doctorat de l'universite de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau*, p. 177

HABA E., PINAZO A., JAUREGUI O., ESPUNY M.J., INFANTE M.R. et MANRESA A. (2003). Physicochemical characterization and antimicrobial properties

PARRA J.L., GUINEA J., MANRESA M.A., ROBERT M., MERCADÉ M.E., COMELLES F. et BOSCH M.P., (1989), Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants, *J.A.O.C.S.*, **66**, (1), 141-145.

Haddad N. I. A., Ji Wang and Bozhong Mu (2009). Identification of a Biosurfactant Producing Strain: *Bacillus subtilis* HOB2. *Protein & Peptide Letters*, *16,* 7-13.

Healy,M.G.,Devine,C.M.,Murphy,R.,(1996). Microbial productin of biosurfactants. Resou

Holmberg K. 2001 Natural surfactants. Current Opinion in Colloid and Interface Science 2001; 6: 148-59.

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

Kanga, S.H., J.S. Bonner, C.A. Page, M.A. Mills and R.L. Autenrieth, (1997). Solubilization of naphthalene from crude oil using biosurfactants. Environ. Sci. Technol., 31: 556-561

Kosaric, N., (1992). Biosurfactants in industry. Pure Applied Chem., 64: 1731-1737 Mulligan, C.N. and S. Wang, 2006. Remediation of a heavy metal-contaminated soil by a rhamnolipid foam. Eng. Geol., 85: 75-81 |

Khopade A, Biao R, Liu X, Mahadik K, Zhang L and Kokare C. (2012). Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine Nocardiopsis sp. B4. *Desalination* 285. 198 – 204.

lang, S. and D. Wullbrandt, (1999). Rhamnose lipids-biosynthesis, microbial production and application potential. Applied Microbiol. Biotechnol., 51: 22-32.

Makkar, RS, Rockne, KJ (2003). Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon. Environ. Toxicol. Chem., 22(10):2280 -2292

Makkar RS, Cameotra SS. (2002) An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. Applied Microbiology and Biotechnology; 58: 428-34.

Marchal N. et Bourdon J. L., (1982). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Ed. Doin*, Paris

Mata-Sandoval, J.C., J. Karns and A. Torrents, (2000). Effect of nutritional and environmental conditions on the production and composition of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UG2. Microbiol. Res., 155: 1-8

MATA-SANDOVAL J. C., KARNS J. et TORRENTS A., (2000). Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides, *Environ. Sci.Technol.*, 34 (23) : 4923-4930.

Mukherjee ,Kishore Das 2010. P2 Microbial Surfactants and Their Potential Applications: An Overview .Ashis K.

Mulligan, 2009 Recent advances in the environmental applications of biosurfactants

Mulligan, C.N. ,Yong, R.N. ,Gibbs, B.F.,2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil:areview.Eng.Geology60,371–380.

Catherine N.Mulligan, Sanjay K.Sharma, Ackmez Mudhoo 2014 biosurfactants research trends and application 2014 .

PORE J., 1992. Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples, Editions Techniques et Industries des Corps Gras, 270 p.

prommachan, O. 2002. Production and application of biosurfactant from Bacillus MUV4. Master of Science Thesis in Biotechnology. Prince of Songk la University, Songkhla, Thailand. 107p

RON E.Z. et ROSENBERG E., (2002), Biosurfactants and oil remediation. *Current Opinion in Biotechnology*, 3 : 249-252

Singleton P., (1999). Bactériologie, *Edition Duonod 4ème édition Paris*. P. 415.

Spoeckner, S., V. Wray, M. Nimtz and S. Lang, 1999. Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. Applied Microbiol. Biotechnol., 51: 33-39.

Tortora G .J., Funke B.R. et Case C. L., 2003. Introduction à la microbiologie. *Ed. de Renouveau pédagogique Inc*. pp : 157- 355.

Van-Dyke, M.I., P. Couture, M. Brauer, H. Lee and J.T. Trevors, 1993. *Pseudomonas aeruginosa* UG2 rhamnolipid biosurfactants: Structural characterisation and their use in removing hydrophobic compounds from soil. Can. J. Microbiol., 39: 1071-1078.

VIPULANANDAN C. et REN X., 2000. Enhanced solubility and biodegradation of naphthalene with biosurfactant. *Journal of Environmental Engineering*, 126 (7) : 629- 634.

WEST et HARWELL, 1992. Surfactants and subsurface remediation *Environ. Sci. Technol.*, 1992, 26 (12), pp 2324–2330

Zhang Y, Maier W, Miller R. 1997. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability, and biodegradation of phenanthrene. *Environ Sci Technol* 31:2211–2217.

Zhang Y, Miller RM. 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a Pseudomonas rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl Environ Microbiol. Oct;58(10):3276–3282

Ramkrishna Sen, MTech, PhD Bioprocess and Bioproduct Development Laboratory, Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology Kharagpur, West Bengal, India, 2010

Gloria Sobero´n Cha´vez ,**2011** Biosurfactants From Genes to Applications, Departamento de Biologı´a Molecular yInstituto de Investigaciones Biome´dicasUniversidad Nacional Auto´noma de Me´xico Bioingenierı Vol. 20