

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/FSNVST/2023

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

Présenté par :

LEULMI Samia & CHOUDANI Adidi

Thème

Effet du substrat sur la production des biosurfactants par des souches bactériennes hydrocarbonoclastes

Soutenu le : 04 /07 /2023

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>Mme IDER Djamila</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Présidente</i>
<i>Mme. YALAOUI-GUELLAL Drifa</i>	<i>MCA</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>Mme. MOURI-HADIDI Lila</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>

Année Universitaire : 2022/2023

Remerciements

*Nous tenons à remercier en premier lieu le **BON DIEU** tout puissant de nous avoir donné volonté, courage et patience d'accomplir ce modeste travail et de nous avoir mis sur le bon chemin.*

*Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements à notre promotrice **Mme YALAOUI-GUELLAL Drifa**, on la remercie chaleureusement pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur, sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de notre préparation de ce mémoire.*

*Nous remercions l'ensemble du jury, **Mme IDER Djamila** pour l'honneur qu'il nous fait en président ce jury et **Mme MOURI-HADIDI Lila** pour avoir accepté l'évaluation de ce mémoire et d'en être examinatrice*

Nous voulons exprimer notre gratitude à tous les employés du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Enfin, il serait difficile pour nous de ne pas remercier tous ceux qui ont contribué à ce travail, de près ou de loin. Qu'ils trouvent dans ces quelques lignes l'expression de nos sincères remerciements.

Dédicaces

Je suis fier de dédier quelques mots pour remercier les forces qui m'ont inspiré, guidé et soutenu tout au long de ma vie.

*Tout d'abord, un immense merci à **Allah** pour m'avoir donné la force, le courage et les moyens nécessaires pour compléter cet humble travail.*

*Je suis également profondément reconnaissant envers **Mes Parents**, mes plus grandes ressources de tendresse, qui m'ont élevé avec amour et compassion. Je tiens à leur demander à Allah de les protéger toujours.*

*À **ma chère sœur**, qui est ma boussole dans la vie, je voudrais exprimer ma gratitude envers elle pour sa présence lors des moments les plus délicats de ma vie.*

*A Mes frères, **LAMINE et GHANI**, sont mes piliers de force dans la vie, mes étoiles du Nord. À ma famille, que j'aime plus que tout et qui a toujours été là pour moi, je leur dis merci.*

*Un grand merci également à tous ceux qui m'ont aidé et encouragé sur mon chemin d'études, mes amies et collègues, **LAILA, LOUIZA, WISSAM, KAOUTHER**, et tous les autres qui ont contribué à mon développement personnel.*

*Enfin, je tiens à remercier ma sœur bien-aimée et binôme, **ADIDI**, ainsi que les personnes qui ont façonné l'individu que je suis devenu aujourd'hui.*

Samia

Dédicace

*J'ai l'honneur de dédier ce modeste travail à mon père **MOHAMED** et ma mère **FATIHA**, je vous aime beaucoup, eux qui se sont sacrifiés corps et âme pour m'offrir le repos et le bonheur, eux qui par leur présence à mes cotées ont rendu chaque moment de ma vie. Merveilleux passage dans le temps, pour l'éducation qu'ils m'ont inculquée. Merci pour le soutien financier, moral, psychologique et matériel.*

*A mes chères sœurs **FARIDA** et **NAWAL** et mes chers frères **MOSTAPHA** et **SAID***

Je leur souhaite une vie remplie de bonheur, de gloire et de succès pour toute l'affection, l'amour et le soutien qu'ils m'ont toujours donnés.

*A mes sources de bonheur : Les anges de mes sœurs **YANIS**, **RAMY**, **AGHILASS***

*A mon plus proche ami **SMAIL** merci d'être toujours à mes côtés*

A mes très chers grands parents qui ne cessent de penser à moi

*A la mémoire de ma grand-mère **ADIDI**, à ma tante **LOUIZA***

À toute ma famille, mes chers cousins et cousines, grands et petits et à tous ceux qui m'aime, merci d'être présent dans ma vie.

*A ma bien aimé, ma binôme **SAMIA** je te remercie du fond du cœur pour tout. Une amie qui a été à mes cotés tous au long de cette année qui a partagé avec moi beaucoup de choses.*

*A mes adorables copines : **Samira**, **Nina**, **Sarah**, **Hassina Rt**, **Hassina**, **Warda**, **Wissam**, **Nassima**, **Sihem**, **Hayet**, **Imene***

A toute la promotion de Biotechnologie Microbienne 2023.

ADIDI

Table des matières

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Partie I : Synthèse bibliographique	
I. Généralités sur les biosurfactants.....	3
I.1. Définition des biosurfactants.....	3
I.2. Classification des biosurfactants	4
I.2.1. Selon le poids moléculaire	5
I.2.1.1. Les biosurfactants de poids moléculaire faible.....	5
I.2.1.2. Les biosurfactants de poids moléculaire élevé.....	5
I.2.2. Selon la structure chimique.....	5
I.2.1. Les glycolipides.....	6
I.2.2. Lipopeptides ou lipoprotéines.....	8
I.2.3. Phospholipides et acides gras.....	10
I.2.4. Les biosurfactants polymériques.....	10
I.2.5. Les biosurfactants particuliers	11
I.3. Les Microorganismes producteurs	11
I.4. Les domaines d'applications des biosurfactants	12
I.4.1. Dans l'industrie pétrolière	13
I.4.2. Dans l'industrie alimentaire.....	14
I.4.3. Dans l'agriculture	15
I.4.4. En médecine.....	16
I.4.5. Dans les cosmétiques	17
I.4.6. Dans l'industrie pharmaceutique	19
I.4.7. Dans l'environnement.....	19
II. Processus de production des biosurfactants.....	21
II.1. La sélection d'organismes	21
II.2. Modification génétique/sélection de la souche.....	23
II.3. Les stratégies de fermentation	26
II.3.1. Culture en Batch	26
II.3.2. Culture en Fed-Batch.....	26
II.3.3. Culture en continu.....	27
II.4. Type et fonctionnement du réacteur	27
II.4.1. Réacteur de fractionnement de mousse.....	28
II.4.2 Réacteurs à membrane	29
II.4.3. Bioréacteurs à boues	30
II.4.4. Fermentation a l'état solide.....	31
II.4.5. Réacteurs à base de cellules immobilisées ou de biofilms	32
II.4.6. Bioréacteur à disque rotatif.....	33
II.4.7. Réacteurs d'extraction in situ	34
II.5. Facteurs influant sur la production de biosurfactants	35
II.5.1. L'effet de sel et salinité.....	35

II.5.2. Le pH	35
II.5.3. L'aération et l'agitation	36
II.5.4. Source de carbone.....	36
II.5.5. Source d'azote	36
II.5.6. Rapport carbone/azote (C/N)	37
II.6. Composition des milieux de culture	37
II.7. Extraction et identification des biosurfactants.....	39

Partie II: Procédures Expérimentales

III. Matériel et méthodes	41
III.1. Matériel	41
III.1.1. Matériel biologique	41
III.1.2. Matériel non biologique	41
III.2. Méthodes	41
III.2.1. Revivification des souches	41
III.2.2. Vérification de la pureté des souches	42
III.2.3. Etude des caractéristiques morphologique et biochimique des souches.....	42
III.2.3.1. Etude macroscopique des souches.....	42
III.2.3.2. Etudes microscopique des souches.....	42
III.2.3.3. Tests biochimiques.....	44
III.2.4. Prétraitement des substrats	48
III.2.5. Préparation des milieux pour la production des biosurfactants	50
III.2.6. Suivi de la production des biosurfactants	50
III.2.6.1. Préparation de la suspension bactérienne.....	50
III.2.6.2. Production des biosurfactants.....	51
III.2.7. Détermination de la biomasse bactérienne totale	51
III.2.8. Dosage des sucres réducteurs	52
III.2.9. Tests de criblage de la production des biosurfactants	53
III.2.9.1. L'activité hémolytique.....	53
III.2.9.2. Test de dispersion du pétrole.....	54
III.2.9.3. Test d'émulsification (E24).....	54
III.2.9.4. Mesure de la tension superficielle.....	55
III.2.10. Extraction du biosurfactants	56
III.2.11. Analyse par spectroscopie IRTF-RTA des biosurfactants.....	57
IV. Résultats et discussion	65
IV.1. Revivification et vérification la pureté des souches	65
IV.2. Etude microbiologique des souches S1 et S2	65
IV.2.1. Aspect macroscopique des souches S1 er S2	65
IV.2.2. Aspect microscopique et biochimique	66
IV.2.2.1. Coloration de Gram.....	66
IV.2.2.2. Caractéristiques biochimiques.....	67
IV.3. Suivi de la production de biosurfactants	68
IV.3.1. L'activité hémolytique	68
IV.3.2. Détermination de la croissance bactérienne	69
IV.3.3. Suivi de l'activité d'émulsification (E24)	72
IV.3.4. Test de déplacement d'huile (DDH)	73
IV.3.5. Test des sucres réducteurs par la DNS	74
IV.3.6. Mesure de la tension superficielle	76
IV.3.7. Détermination de poids sec des biosurfactants.....	77

IV.3.8. Analyse par spectroscopie IFTF-ATR	78
Conclusion.....	82
Références bibliographiques	84
Annexes	
Résumés	

Liste des abréviations

ADH : L'arginine dihydrolase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AL : Agar Luria

AMY : Amygdaline

AN : Agar nutritif

ARA : Arabinose

Asn : Asparagine

ATR : Réflexion Totale Atténuée

BBS : Biomasse bactérienne sèche

BS : Biosurfactants

C/N : Carbone/Azote

CCM : Chromatographie sur Couche Mince

cg/cm³ : Centigramme par centimètre cube

CIT : citrate

Cm : centimètre

CMC : Concentration Micellaire Critique

CO₂ : Carbon dioxide

CSTR : Réacteurs à cuve agitée en continu

DNS : Acide 3,5-dinitrosalicylique

DO : Densité Optique

E24 : L'indice d'émulsification

GC-MS : Gas Chromatography–Mass Spectrometry (Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse)

GEL : Gélatine

Gln : Glutamine

Glu : Acide glutamique

GN : Gélose Nutritive

H₂S : Sulfure d'hydrogène

HCL : Hydrochloric acid

Ile : Isoleucine

INO : Inositol

IRTF-RTA : Analyse spectroscopique par Infrarouge à transformée de Fourier en mode réflectance total atténuée

KBr : bromure de potassium

ARN : Acide ribonucléique

LDC : Lysine Décarboxylase

Leu : Leucine

MAN : Mannitol

MB : Milieu de l'épluchure de Banane

MDDS : Systèmes de Délivrance de Médicaments

MEL: Melibiose

MEL: Mannosyl Erythritol Lipids (Lipides de mannosyl érythritol)

MEOR : Microbial Enhanced Oil Recovery (Récupération d'huile microbienne améliorée)

MG : Milieu de Glucose

MH : Milieu d'Huile de friture

ML : Milieu de lactosérum

mN/m : milli Newton par mètre

MS: Spectrométrie de Masse

MSM : Milieux Seles Minéraux

N₂ : Azote

NaCl : Sodium chloride

NaOH : Sodium hydroxide

NO₂ : Dioxyde d'azote

NRPS : Non ribosomal Peptide Synthétases

ODC : l'ornithine décarboxylase

ONPG: l'Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside

p/v : Poids / volume

RHA : Rhamnose

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

rpm : Révolutions par minute

SAC : Saccharose

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

Ser : Serine

SOR : Sorbitol

TDA : Tryptophane Sulfure D'hydrogène

Thr : Threonine

TS : Tension Superficielle

UV-Vis : Ultra-Violette et Visible

Val : Valine

VP : Voges-Proskauer

Liste des figures

Figure 1 : Un surfactant sous forme de monomère	3
Figure 2 : Illustration schématique de l'agent tensioactif et de la formation de micelles	3
Figure 3 : Variations de la tension superficielle et la formation des micelles en fonction de la concentration en surfactant	4
Figure 4 : Schéma représentant les types de biosurfactants déterminés par la polarité de leur groupe de tête	5
Figure 5 : Les Principales classes de biosurfactants et leurs structures	6
Figure 6 : Structure chimique des glycolipides les plus étudiés	7
Figure 7 : Structures chimiques du mono-rhamnolipide et du di-rhamnolipide.	7
Figure 8 : Deux couches de phospholipides adjacentes forment une membrane cellulaire	10
Figure 9 : Potentiels d'applications des biosurfactants	13
Figure 10 : Schéma du mécanisme impliqué dans le MEOR médie par un biosurfactants	14
Figure 11 : Quelques applications des biosurfactants microbiens dans les aliments.....	15
Figure 12 : Schéma de l'influence du biosurfactants sur le rôle des pesticides en agriculture	16
Figure 13 : Principales applications des biosurfactants dans le domaine de la médecine	17
Figure 14 : Stabilisation de la vitamine C par un Biosurfactant	18
Figure 15 : Schéma représentant les différentes étapes d'isolement, de caractérisation et d'identification des souches productrices des biosurfactants.....	22
Figure 16 : Représentation schématique de quelques stratégies d'ingénierie générique impliquées dans la production de biosurfactants.....	24
Figure 17 : Représentation schématique des différents types des stratégies de fermentations	26
Figure 18 : Schéma représentant la construction de base d'un réacteur CSTR	28
Figure 19 : Schéma d'une configuration expérimentale pour le fractionnement de la mousse	29
Figure 20 : Représentation schématique des bioréacteurs utilisés pour la production de lipopeptides par <i>B. subtilis</i>	30
Figure 21 : Technologie des bioréacteurs à boue.....	31
Figure 22 : Schéma du fermenteur à l'état solide pour la conversion de la biomasse ligno-cellulosique en enzymes.....	32
Figure 23 : Schéma du réacteur de biofilm couplé à l'adsorption en lit fixe.....	33
Figure 24 : Représentation schématique du bioréacteur à disques rotatifs et du dispositif expérimental	34
Figure 25 : Accumulation de produits sophorolipides et hétérogénéité du bioréacteur au cours de la fermentation.....	35
Figure 26 : Revivification des souches	42
Figure 27 : Etapes de préparation du frottis	43
Figure 28 : Procédure de coloration de Gram	44
Figure 29 : Test de catalase	45
Figure 30 : Préparation de la poudre des coquilles d'œufs	49

Figure 31 : Filtration et mesure de pH de lactosérum.....	49
Figure 32 : Etapes de préparation des milieux MSN avec les différentes sources de carbone.....	50
Figure 33 : Réalisation de la centrifugation des surnageants.....	51
Figure 34 : Etapes de mesure de la biomasse sèche.....	52
Figure 35 : Dosage des sucres réducteurs.....	53
Figure 36 : Etapes de réalisation du test d'hémolyse.....	53
Figure 37 : Test de déplacement d'huile.....	54
Figure 38 : Quelques étapes de test d'émulsification (E24).....	55
Figure 39 : Schéma représentatif de la tension interfaciale et superficielle.....	56
Figure 40 : Mesure de la tension superficielle.....	56
Figure 41 : Schéma synthétique du protocole de l'extraction du biosurfactants.....	57
Figure 42 : Spectrophotomètre Infrarouge à Transformée de Fourier.....	58
Figure 43 : Résultats de la revivification et de la vérification de la pureté des souches.....	65
Figure 44 : Résultats de test d'hémolyse sur les deux souches S1 et S2.....	69
Figure 45 : Biomasse bactérienne sèche des deux souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisés.....	70
Figure 46 : Evaluation d'indice d'émulsification pour les souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisés.....	72
Figure 47 : Résultats de déplacement d'huile des biosurfactants pour les souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisés.....	73
Figure 48 : Résultats de dosage des sucres réducteurs à t=0 pour les deux souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisés.....	74
Figure 49 : Résultats de dosage des sucres réducteurs à t=final pour les deux souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisés.....	75
Figure 50 : Evaluation de la tension superficielle pour les deux souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisés.....	76
Figure 51 : Spectres d'infrarouge de la souche S1 dans les différents milieux utilisés.....	79
Figure 52 : Spectres d'infrarouge de la souche S2 dans les différents milieux utilisés.....	80

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales catégories de biosurfactants et leurs quelque microorganisme producteurs correspondants.....	12
Tableau 2 : Quelques stratégies utilisées pour modifier génétiquement les micro-organismes producteurs des BS	25
Tableau 3 : Résumé de certains substrats clés de faible valeur utilisés pour la production de biosurfactants	38
Tableau 4 : Résumé des méthodes de séparation des biosurfactants avec leurs principes. ...	40
Tableau 5 : Les caractères macroscopiques des souches S1 et S2.....	65
Tableau 6 : L'aspect microscopique des souches S1 et S2 après la coloration de Gram.....	66
Tableau 7 : Quelques caractéristiques biochimiques des bactéries étudiées.	67
Tableau 8 : Rendement des biosurfactants après extraction par précipitation en mg/ml.....	77
Tableau 9 : Plages de fréquences vibratoires caractéristiques de certains groupes fonctionnels organiques courants.....	78

Introduction

En raison de ses effets néfastes sur l'environnement et la santé humaine, la production de déchets devient une préoccupation mondiale. Cependant, un changement de perspective concernant l'utilisation des déchets comme matière première pour produire des produits à valeur ajoutée a ouvert la voie à la durabilité environnementale. De plus, l'impact environnemental des surfactants synthétiques a accru l'intérêt pour l'utilisation de surfactants inoffensifs pour l'environnement provenant de sources naturelles (Gaur et al., 2022).

De nombreuses études ont été menées pour résoudre ces problèmes en utilisant des microorganismes pour produire de biosurfactants en tant que métabolites secondaires en utilisant des flux de déchets (Gaur et al., 2022). Ces biosurfactants ont peu de toxicité, de biodégradabilité et d'impact sur l'écosystème (Sajna et al., 2013). Ces caractéristiques rendent les biosurfactants utiles dans un large éventail de domaines, y compris l'environnement, la production d'aliments et de boissons, les produits pharmaceutiques et les cosmétiques (Kee et al., 2021; Varjani et al., 2021).

La production de biosurfactants est réduite au niveau mondial à cause des coûts élevés des matières premières et de la transformation en aval (Adesra et al., 2021). Plus de la moitié des dépenses peut être attribuée au prix des matières premières (Kee et al., 2021). Étant donné que les matières premières représentent 30 % du prix de la biotechnologie, il est viable d'utiliser les résidus industriels comme milieu (Cameotra et Makkar, 1998). Selon Makkar (2002), les résidus agro-industriels à haute teneur en carbone constituent une alternative viable pour la production de biosurfactants.

Les sous-produits de l'industrie des légumes, les déchets d'huile de friture des restaurants, les déchets de l'industrie laitière et sucrière sont parmi les sous-produits à faible coût utilisés comme sources de carbone pour la production de biosurfactants par des microorganismes (Makkar et al., 2011). Bien que des recherches continuent sur l'utilisation de sources non conventionnelles, il reste un défi de choisir les substrats de déchets appropriés (Nawawi et al, 2010).

Ce travail a été réalisé dans cette perspective et il est composé de deux parties distinctes:

La section bibliographique, divisée en deux chapitres le premier présente une généralité sur les biosurfactants (définition, classification et domaine d'application) et le second chapitre présente les processus de production des biosurfactants.

La section pratique, le troisième chapitre consacré à la présentation du matériel et des techniques utilisées pour évaluer la capacité des bactéries hydrocarbonoclastes à produire des biosurfactants en utilisant des déchets agro-industriels tels que les pelures de banane, le lactosérum, l'huile de friture et les couilles d'œufs comme source de carbone alternative, la production a été suivie par des tests et l'identification phénotypiques des bactéries productrices des biosurfactants. Les résultats des expériences sont analysés dans le chapitre final et discuter avec d'autres travaux antérieurs sur la production des biosurfactants.

Enfin, cette étude se termine par une conclusion suivie par une liste des références puis des annexes.

Partie I :
Recherche bibliographique

Chapitre I

Chapitre I. Généralités sur les biosurfactants

I.1. Définition des biosurfactants

Les biosurfactants est un mot portemanteau composé de deux parties : «bio» et «surfactant» qui désigne un agent superficiellement actif, produit à partir d'une origine biologique tels que : les bactéries, les champignons et les levures (Mukherjee et al., 2006).

Les biosurfactants sont encore défini comme des molécules amphiphiles composés de deux parties : hydrophile polaire et hydrophobe non polaire (Figure 01). Généralement, le groupement hydrophile est composée de mono- di- ou polysaccharides, d'acides aminés de peptides, alors que le groupement hydrophobes est composée d'acides gras saturés ou non-saturés et des acides gras hydroxylés ou des alcools gras (Pacwa-Płociniczak et al., 2011).

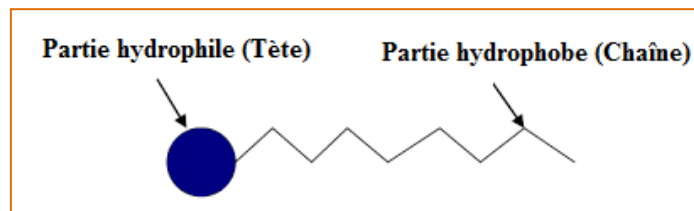


Figure 01 : Un surfactant sous forme de monomère (Zenati, 2018).

Ces composés peuvent produire des micelles et des microémulsions à travers des phases distinctes et aussi réduire la tension superficielle entre deux phases de polarités différentes l'huile et l'eau, l'air et l'eau ou l'eau et un solide (Smyth et al., 2010; Pacwa-Płociniczak et al., 2011). Les micelles se définissent comme étant un arrangement thermodynamiquement stable de molécules amphiphiles sous la forme d'une sphère (Figure 02) possédant une extrémité hydrophile et un intérieur hydrophobe (Pacwa-Płociniczak et al., 2011).

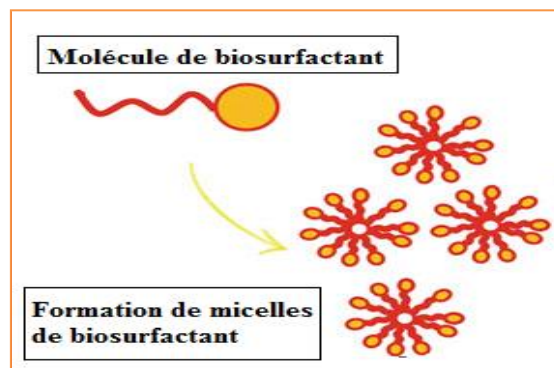


Figure 02 : Illustration schématisée de l'agent tensioactif et de la formation de micelles (Srivastava, 2021).

Ils jouent un rôle crucial dans des processus tels que l'émulsification, la solubilisation et l'augmentation de la surface des contaminants d'hydrocarbures pour leur dégradation microbienne. Leur propriété unique est de réduire les tensions de surface, interfaciales et la concentration micellaire critique (CMC) (Figure 03) dans les solutions aqueuses et les mélanges d'hydrocarbures (Banat, 1995 ; Rahman et al.,2002).

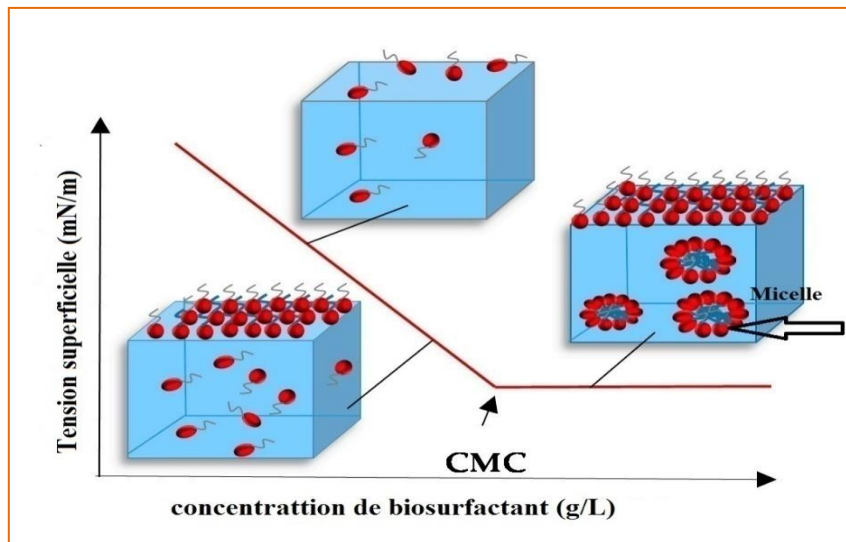


Figure 03 : Variations de la tension superficielle et la formation des micelles en fonction de la concentration en surfactant (Santos et al., 2016).

Les biosurfactants sont des produits sélectifs, moins toxiques et biodégradables, par opposition à leurs homologues chimiques (Kosaric et Sukan, 2014). Il est un produit biotechnologique essentiel pour de nombreuses applications industrielles, notamment dans l'alimentation, les cosmétiques, les produits de nettoyage, les médicaments et la médecine, ainsi que le pétrole et le gaz (Ahuja et Singh, 2020).

I.2. Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés en fonction de leur charge ionique, qui peut être anionique, cationique, zwitterionique ou non ionique (Figure 04). Cette charge ionique est présente sur la partie polaire des molécules de tensioactif, les biosurfactants diffèrent considérablement de leurs homologues synthétiques et peuvent être classés en fonction de leurs propriétés chimiques et physiques, et de leur poids moléculaire (Ahamed et Prasad, 2021).

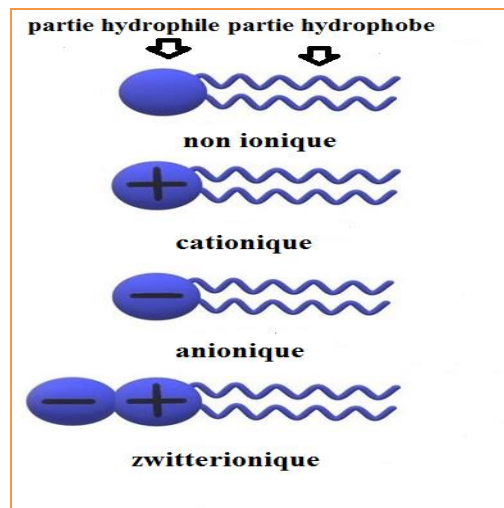


Figure 04 : Schéma représentant les types de biosurfactants déterminés par la polarité de leur groupe de tête (Inamuddin et al., 2019).

I.2.1. Selon le poids moléculaire

Les biosurfactants sont classés en deux types (Aslam et al., 2023).

I.2.1.1. Les biosurfactants de poids moléculaire faible

Ils sont caractérisés par des tensions superficielles et interfaciales inférieures. Appartiennent à la catégorie des phospholipides, des lipopeptides et des glycolipides (Christofi et Ivshina, 2002). Les espèces *Pseudomonas* et *Bacillus* sont largement reconnues pour leur capacité à produire des biosurfactants de faible poids moléculaire (Edosa et al., 2018).

I.2.1.2. Les biosurfactants de poids moléculaire élevé

Ils sont appelés collectivement bio-émulsines ou des bio-émulsifiants qui se lient étroitement aux surfaces (Saharan et al., 2011). Des substances ayant une capacité élevée de liaison de surface. Sont principalement des tensioactifs particuliers et polymères (Ron et Rosenberg, 2001). La plupart des biosurfactants à poids moléculaire élevé peuvent être produits par *Acinetobacter* (Edosa et al., 2018).

I.2.2. Selon la structure chimique

Les biosurfactants sont classés, selon la structure chimique, de manière générale en plusieurs catégories, telles que les glycolipides, les lipopeptides, les biosurfactants polymériques, les acides gras et les phospholipides, les biosurfactants particuliers. Les

principales classes des biosurfactants et leurs structures sont présentes dans la Figure 05 (Aslam et al., 2023).

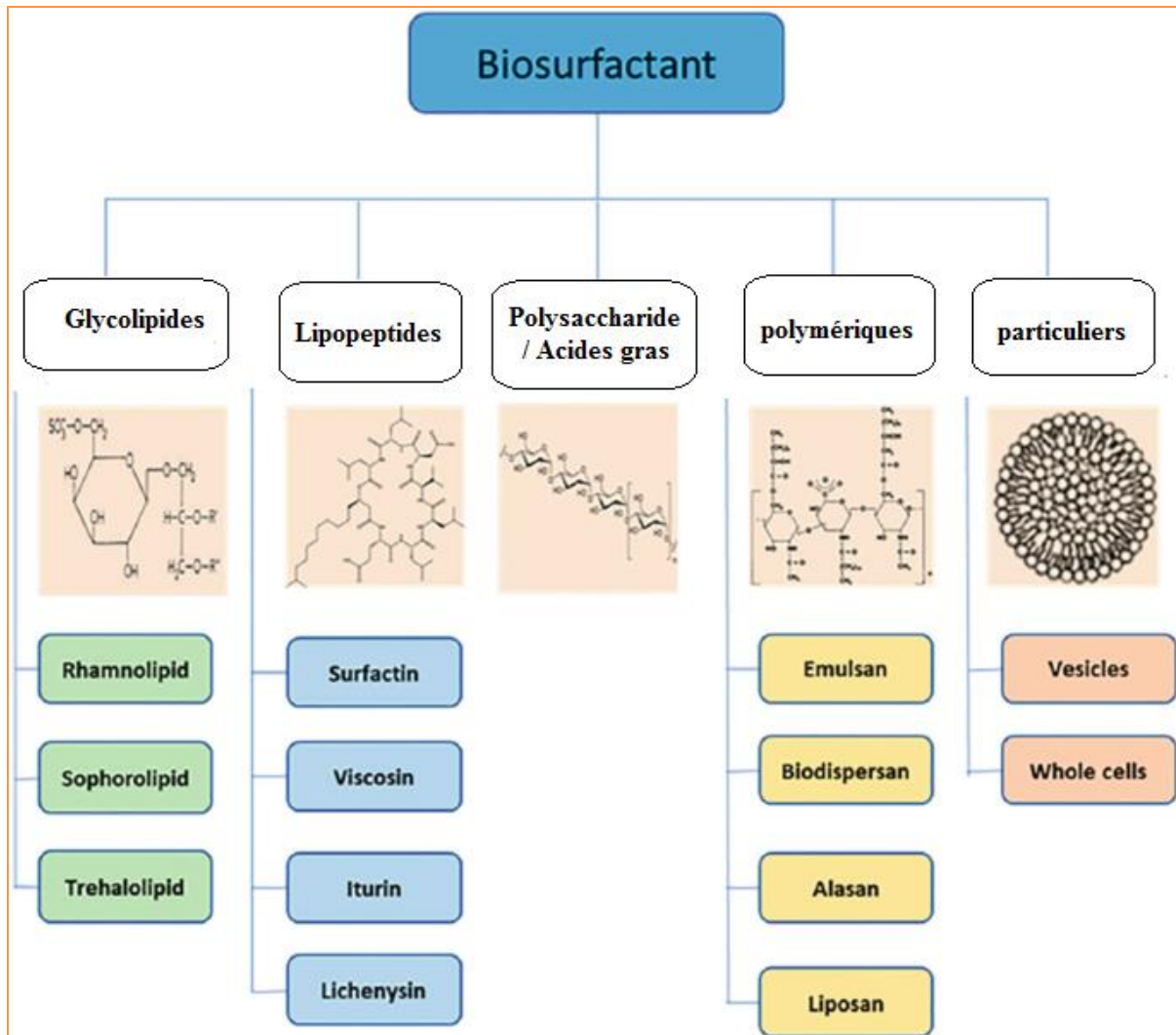


Figure 05 : Les Principales classes de biosurfactants et leurs structures (Sharma et al., 2021).

I.2.1. Les glycolipides

Les biosurfactants les plus recherchés et les plus connus sont les glycolipides. Il s'agit d'acides aliphatiques à longue chaîne ou d'acides hydroxy aliphatiques attachés aux hydrates de carbone travers un groupe d'esters. les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides sont les glycolipides les plus étudiés (Figure 06) (Aslam et al., 2023).

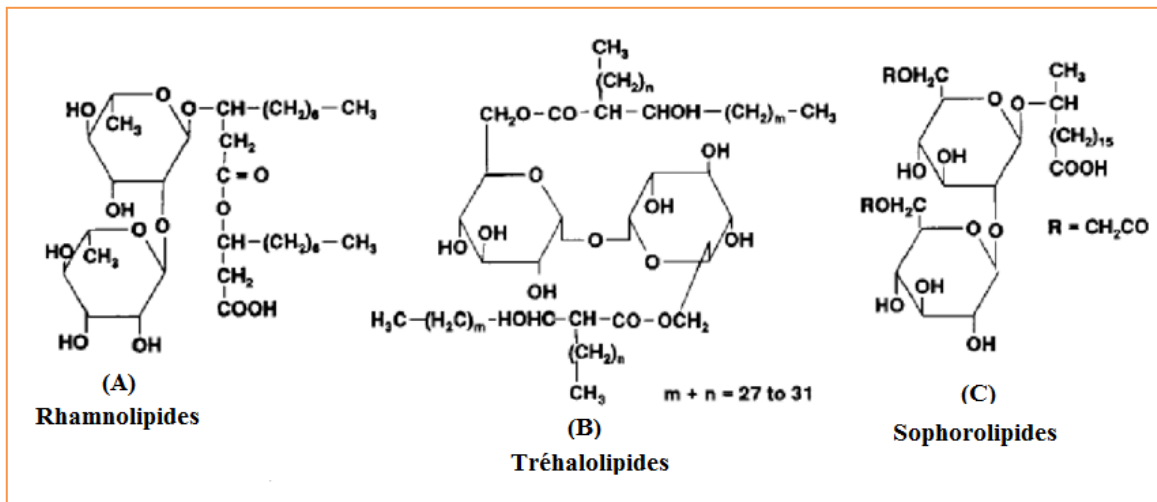


Figure 06 : Structure chimique des glycolipides les plus étudiés (Zenati., 2018).

a. Rhamnolipides

Ce sont des lipides extracellulaires fabriqués par des bactéries du genre *Pseudomonas* c'est le *Pseudomonas aeruginosa* comme homologue mélange de différentes espèces. Les hydrocarbures peuvent être émulsifiés par eux, et des rapports sur leurs propriétés antibactériennes et antifongiques ont également été mentionnés (Rahman et al., 2002).

Les rhamnolipides naturels se présentent sous forme de mélanges de différents congénères. ils contiennent du rhamnose et d'acides gras 3-hydroxy (hydrophobique moitié) et une fraction hydrophile de disaccharide (Figure07) (Lang et Wullbrandt, 1999).

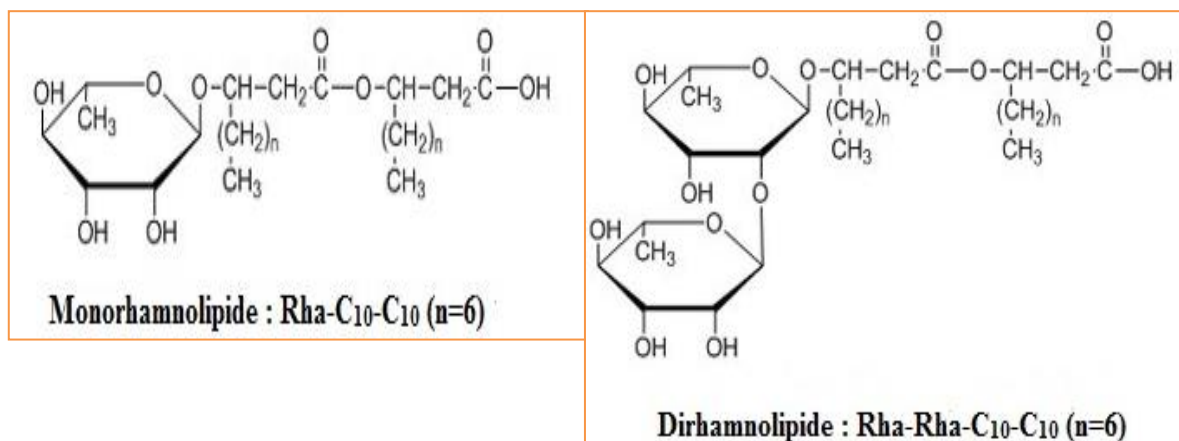


Figure 07 : Structures chimiques du mono-rhamnolipide et du di-rhamnolipide (Ahamed et Prasad, 2021).

b. Sophorolipides

Ce sont des glycolipides produits par des levures. Ils sont constitués un acide gras hydroxyle à longue chaîne lié à un glucide dimérique appelé sophorose via une liaison glycosidique. Le sophorolipides sous forme lactone, composé de six à neuf sophorolipides hydrophobes distincts, est utilisé dans de nombreuses applications (Asmer et al., 1988 ; Gaur et al., 2019).

Il possède des propriétés antibactériennes, anti-inflammatoires, et régulatrices du système immunitaire, le rendant adapté à des applications médicales et cosmétiques pour ses qualités hydratantes et émulsifiantes (Asmer et al., 1988 ; Gaur et al., 2019).

c. Tréhalolipides

Ces caractéristiques sont partagées par la grande majorité des espèces de *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Corynebacterium*. En milieu de culture, la tension interfaciale et la surface des particules lipidiques de tréhalose de *Rhodococcus erythropolis* et *Arthrobacter spp* chute à 25–40 et 1–5 mN/m respectivement (Bages-Estopa et al., 2018).

Ces molécules ont des degrés de saturation variés ainsi que des formes et des tailles différentes et expriment des activités physiologiques prometteuses dans des conditions extrêmes (Kashif et al., 2022).

I.2.2. Lipopeptides ou lipoprotéines

Les lipopeptides sont des protéines composées de queues acyle et de séquences oligopeptidiques linéaires avec un lien amide. Ils peuvent réduire la tension interfaciale et superficielle et ont le potentiel d'agents anticancéreux et antibactériens. Différents groupes de lipopeptides surfactants comprennent viscosine, iturine, serrawettin, gramicidine et polymyxine (Cochrane et Vederas, 2016 ; Carrillo et al., 2003). Parmi Les types de lipopeptides sont présentés ci-dessous.

a. La Surfactine

C'est un lipopeptide cyclique avec sept acides aminés, y compris L-asparagine (Asn), L-leucine (Leu), acide glutamique (Glu), leucine (Leu) et L-valine (Val) ainsi que deux D-leucines liées entre elles par une liaison lactone. À ce jour, plus de 30 variétés de surfactine

ont été identifiées, chacune présentant une combinaison unique de résidus d'acides gras et d'acides aminés (Sajid et al., 2020).

Il est largement utilisé dans plusieurs applications grâce à ses propriétés antibactériennes, antivirales et antifongiques. Il est également efficace comme stabilisant, émulsifiant et modificateur de surface (Salek et Euston, 2019). La tension superficielle peut être réduite entre 72 et 27 mN m⁻¹, De plus, ces surfactines ont montré une faible concentration micellaire critique (CMC), et son utilisation est étudiée dans diverses applications (Datta et al., 2018).

b. Les Iturines

Les iturine sont des lipopeptides cycliques non ribosomiques à sept résidus et un acide aminé, ils sont principalement produits par *Bacillus sp.* Il n'est pas connu qu'elles diffèrent des autres antibiotiques lipopeptidiques de quelque manière que ce soit et ont le potentiel d'être utilisés en biomédecine et en lutte biologique en raison de leurs propriétés hémolytiques et antifongiques (Aslam et al., 2023).

c. Les Lichenysines

Les lichenysines sont produites par *Bacillus licheniformis*. Qui sont les biosurfactants cycliques lipoheptapeptidiques anioniques les plus efficaces, dans un milieu sans hydrocarbures avec le glucose comme principale source de carbone (Aslam et al., 2023).

Ils peuvent réduire la tension superficielle de l'eau de 72 à 27 mN/m. Ils sont appelés lichenysine A, B, C, D, G et surfactant BL86 en fonction des variantes spécifiques à l'espèce. Le peptide des lichenysines a sept acides aminés, dont L-Gln - L-Leu - D-Leu - L-Val - L-Asp - D-Leu - L-Ile (Isoleucine) (Aslam et al., 2023).

d. Les Viscosines

Ce sont des lipopeptides de 9 acides aminés, dont L-Leu-D-Gln-D-Thr-D-Val-L-Leu-D-Ser-L-Ile, liés au -hydroxydécanoyle C10-C12 l'acide gras est appelé viscosine (Janek et al., 2020).

A l'aide des enzymes peptidiques non ribosomiques synthétase (NRPS), la viscosine est générée par des bactéries marines et du sol, dont *Pseudomonas sp*, *Viscosinamides*, *Pseudo-desmines* et *Massetolidis* (Geudens et al., 2017).

I.2.3. Phospholipides et acides gras

Les acides gras et les phospholipides, considérés comme des biosurfactants, font partie des sous-produits de l'oxydation microbienne des alcanes (Rehm et Reiff, 1981).

Ces acides gras peuvent avoir une chaîne droite ou une structure compliquée avec des groupes hydroxyle et des ramifications alkyle (Rahman et Gakpe, 2008). L'équilibre d'hydrophile et d'hydrophobicité de l'acide gras est fortement lié à la longueur de la chaîne hydrocarbonée et à son degré de complexité. La majorité des acides gras tensioactifs ont de 12 à 14 atomes de carbone (Rosenberg et Ron, 1999).

Les phospholipides sont composés de deux composants: hydrophobe et hydrophile, avec un groupe de phosphates hydrophiles à une extrémité et des acides gras hydrophobes à l'autre (Figure 08). Les biosurfactants phospholipidiques sont des éléments importants de la membrane plasmique microbienne. Si la souche microbienne se développe en présence d'hydrocarbures, les niveaux de phospholipides augmentent de manière significative (Rahman et Gakpe, 2008).

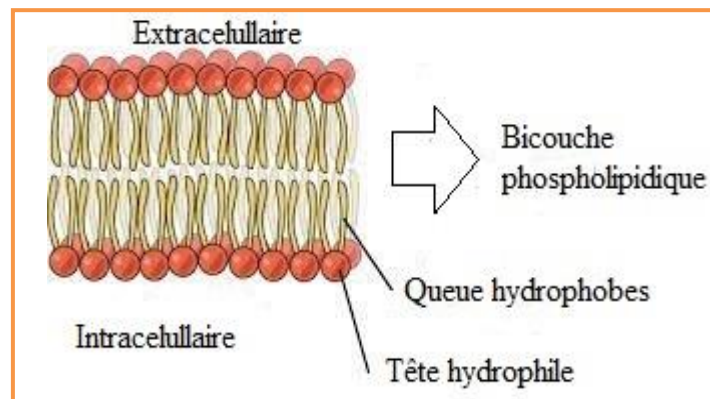


Figure 08 : Deux couches de phospholipides adjacentes forment une membrane cellulaire (Rahman et Gakpe, 2008).

I.2.4. Les biosurfactants polymériques

Les biosurfactants polysaccharidiques-protéiques les mieux étudiés sont l'émulsan, alasan et lipomannans, l'émulsan est un émulsifiant efficace soluble dans l'eau qui peut être utilisé comme agent émulsifiant pour les hydrocarbures dans l'eau. *Candida lipolytica* produit du liposan, composé à 83 % de glucides et à 17 % de protéines. Le biosurfactant polymère est le plus souvent utilisé dans les secteurs cosmétique et alimentaire (Aslam et al., 2023).

I.2.5. Les biosurfactants particuliers

Un fragment essentiel pour la réparation des alcanes par les microbes est microémulsion, constitué de segments de vésicules extracellulaires en film d'hydrocarbures. Les éléments primaires des vésicules produites par *Acinetobacter sp.* ont une épaisseur de 1,158 μm et un diamètre de 20 à 50 nm. Ces éléments sont les protéines, les phospholipides et les lipopolysaccharides (Aslam et al., 2023).

I.3. Les Microorganismes producteurs

Différents microorganismes, tels que les bactéries, les champignons et les levures, peuvent être des sources potentielles pour la production de biosurfactants, en fonction des conditions environnementales et physiologiques. La quantité de biosurfactants produits dépend du type de microorganisme et de la disponibilité des nutriments (Singh et al., 2017).

La principale fonction physiologique d'un biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en abaissant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, ce qui la rend plus facilement disponible pour les cellules (Mata-Sandoval et al., 2000).

Il existe de nombreux microorganismes extrêmophiles dans divers environnements marins extrêmes, tels que les événements hydrothermaux, les sources chaudes, les lacs salés et les fonds marins profonds. La capacité de ces microorganismes à résister à des températures, des niveaux de salinité et de pression extrêmes, montre qu'ils ont un grand potentiel pour être utilisés dans des applications biotechnologiques (Dalmaso et al., 2015).

Les genres bactériens connus pour leur production de biosurfactants comprennent: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Thiobacillus*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax*, et *Halomonas* (Bodour et al., 2003 ; Mnif et al., 2011). Le tableau 01 présente une liste de microorganismes producteurs de biosurfactants (Santos et al., 2016)

La synthèse des biosurfactants dans de nombreuses espèces est encore peu comprise en ce qui concerne leur régulation, à l'exception des souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont actuellement les plus étudiées (Banat et al., 2000).

Tableau 01 : Les principales catégories de biosurfactants et leurs quelque microorganisme producteurs correspondants (Santos et al., 2016).

Biosurfactants	Microorganismes producteurs
Glycolipides	<i>Arthrobacter sp</i> <i>Candida antarctica</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Nocardia sp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas sp</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Biosurfactants polymériques	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida utilis</i> <i>Mycobacterium</i> <i>Sphingomonas paucimobilis</i>
Lipopeptides	<i>Acinetobacter sp</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Acides gras	<i>Arthrobacterparaffineus</i> <i>Capnocytophaga sp</i> <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i>
Phospholipides	<i>Acinetobacter sp</i> <i>Aspergillus</i> <i>Corynebacterium lepus</i>
Biosurfactants particuliers	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Cyanobacteria</i> <i>Pseudomonas marginalis</i>

I.4. Les domaines d'applications des biosurfactants

Les biosurfactants sont de plus en plus reconnus comme des substances efficaces dans divers domaines, et leurs applications ont été largement étudiées dans le pétrole, l'alimentation, les boissons, les cosmétiques, les détergents, les textiles, les peintures, minière, la pharmacie et la nanotechnologie (Santos et al., 2016). Certaines des applications commerciales les plus importantes des biosurfactants sont résumées dans la Figure 09.

En raison de leur capacité à réduire la tension de surface et la tension interfaciale à de faibles concentrations critiques en micelles (CMC). Avec la croissance de la sensibilisation environnementale et la demande croissante de produits non toxiques et biodégradables, l'utilisation des biosurfactants dans de nouveaux produits connaît une augmentation exponentielle grâce aux avancées technologiques (Kashif et al., 2022).

Le coût de production des BS est devenu compétitif par rapport aux surfactants chimiques synthétiques grâce à l'utilisation de substrats renouvelables bon marché et de déchets organiques (Konwar, 2022).

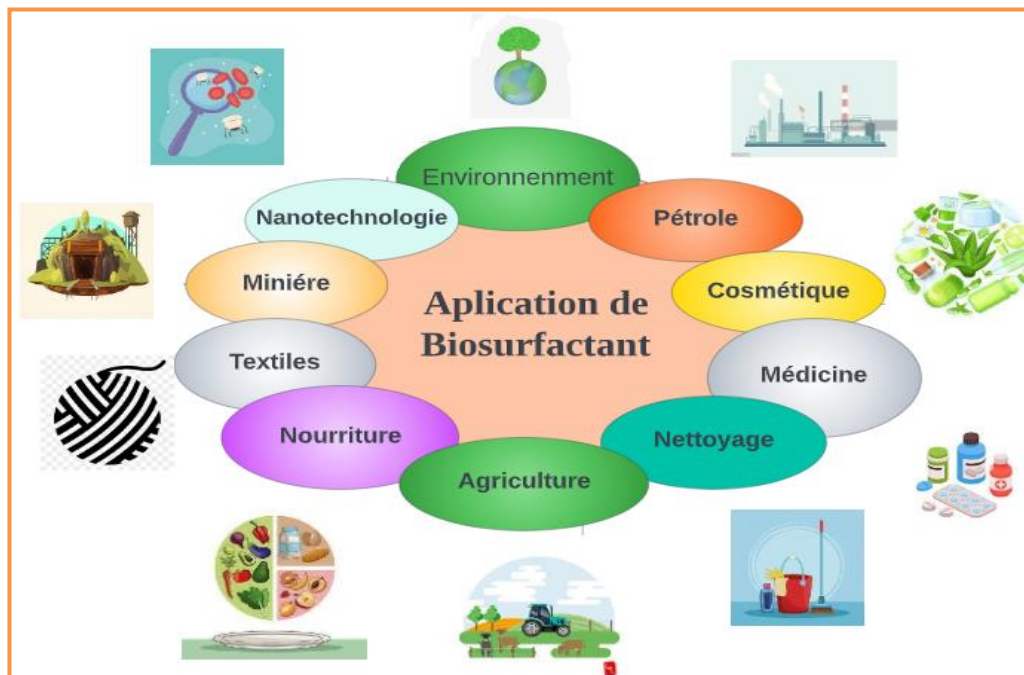


Figure 09 : Potentiels d'applications des biosurfactants (Inamuddin et al., 2019).

I.4.1. Dans l'industrie pétrolière

L'application de biosurfactants dans l'industrie pétrolière a été largement rapportée et appliquée sur le terrain. Les biosurfactants ont montré de manière cohérente de bons résultats dans les applications de MEOR. (Varjani et al., 2021).

MEOR implique l'utilisation de biosurfactants pour augmenter la mobilité des hydrocarbures, ce qui améliore l'extraction du pétrole brut piégé du réservoir. La technologie de MEOR peut être appliquée de deux manières dans les méthodes in-situ et ex-situ en raison des exigences de faible pureté (Varjani et al., 2021; Geetha et al., 2018).

Dans la méthode *in situ*, les biosurfactants produisant des micro-organismes sont injectés dans le puits de pétrole, suivis de l'injection d'eau, ce qui augmente la charge microbienne dans la colonne, et par conséquent, améliore la récupération du pétrole brut. Alors que, dans la méthode *ex-situ*, les biosurfactants sont produits à l'extérieur du réservoir puis injectés dans le puits pour faciliter l'extraction du pétrole brut restant (Varjani et al., 2021; Geetha et al., 2018).

Une étude particulièrement importante a montré que l'augmentation de la récupération de pétrole à l'aide de biosurfactants (surfactine et rhamnolipide) par rapport aux surfaces actives commerciales augmente la récupération de pétrole. Un schéma de MEOR est présenté dans la Figure 10 (Sakthipriya et al., 2021).

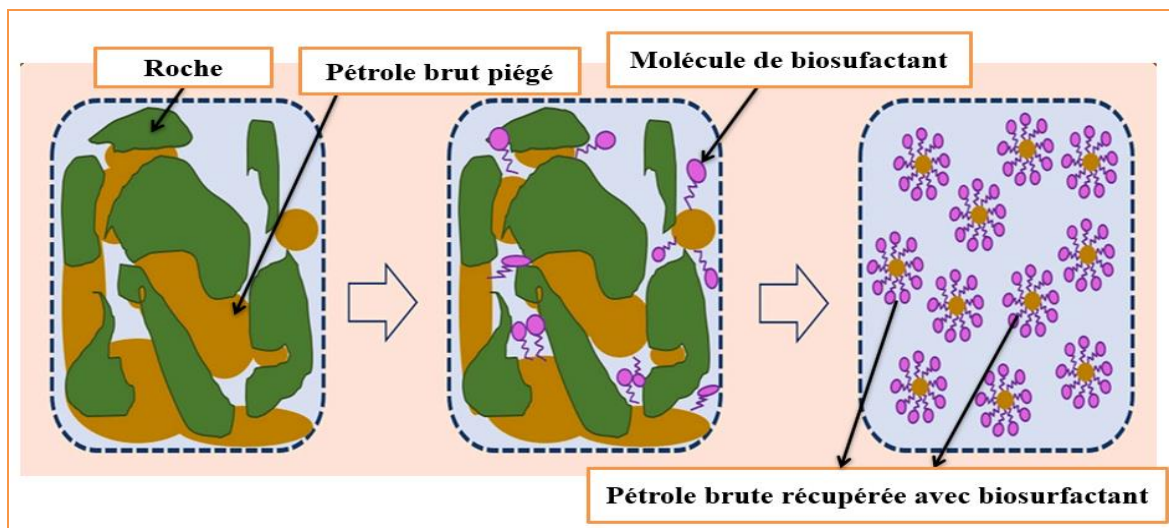


Figure 10: Schéma du mécanisme impliqué dans le MEOR médie par un biosurfactants (Kashif et al., 2022).

I.4.2. Dans l'industrie alimentaire

Les biosurfactants sont utilisés dans l'industrie alimentaire comme additifs et conservateurs en raison de leurs propriétés antibactériennes et émulsifiantes. Ils permettent de contrôler facilement la consistance des produits à base de matières grasses, la stabilité des systèmes aérés et l'agglomération moléculaire. Les émulsifiants aident à prolonger la durée de conservation des produits alimentaires en minimisant la séparation des phases grâce à la formation de globules, et les biosurfactants sont utilisés comme alternative aux émulsifiants d'origine végétale tels que le soja, car ils offrent des avantages pour le contrôle des émulsions complexes avec des lipides dans des phases aqueuses (McClements et Gumus, 2016).

Les biosurfactants sont efficaces pour solubiliser les huiles aromatiques dans les produits alimentaires, comme la crème glacée, afin d'améliorer leur arôme. Les rhamnolipides sont utilisés pour améliorer la texture et les propriétés de divers produits alimentaires tels que la crème au beurre, les pâtisseries, le yaourt et les croissants (Figure 11) présente quelques applications des biosurfactants microbiens dans les aliments.

Les biosurfactants possèdent des caractéristiques antioxydantes importantes dans le traitement des aliments, car ils inhibent le brunissement non enzymatique et la croissance des microorganismes (Kashif et al., 2022).

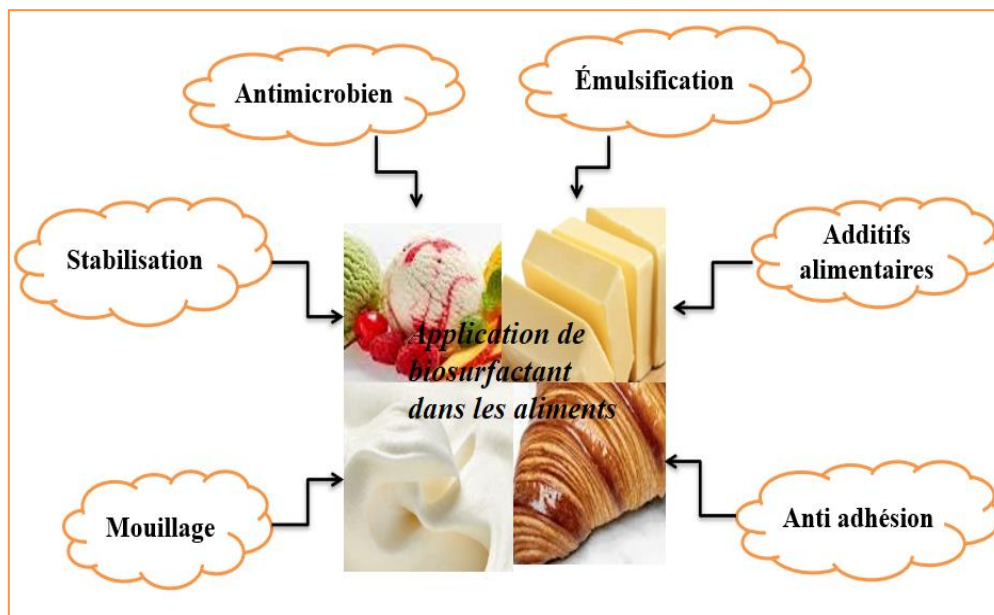


Figure 11 : Quelques applications des biosurfactants microbiens dans les aliments (Kashif et al., 2022).

I.4.3. Dans l'agriculture

Les biosurfactants sont également utilisés dans les pratiques agricoles en tant que composant essentiel des pesticides et des herbicides. Ils agissent comme des bio-émulsifiants, rendant les feuilles des plantes hydrophobes, ce qui empêche le contact direct entre les microbes et les feuilles des plantes, minimisant ainsi les risques d'infection des plantes et pouvant également prévenir la croissance microbienne en agissant comme agent antimicrobien (Ahamed et Prasad, 2021).

Il a été observé que leur présence dans les pesticides facilite le mouvement des substances toxiques vers leur cible respective. Des biosurfactants ont été utilisés avec des pesticides pour améliorer la surface de contact qui facilite l'accès des pesticides aux

organismes ou ravageurs cibles (Figure12). Les glycolipides, des biosurfactants produits par différentes espèces microbiennes, ont également été utilisés pour stimuler l'immunité chez les plantes et les animaux (Chen et al., 2017 ; Borsanyiova et al., 2016).

En général, l'utilisation directe de produits chimiques dangereux sur les cultures est généralement évitée. Les biosurfactants, qui sont respectueux de l'environnement et biodégradables, sont considérés comme une alternative écologique aux produits chimiques toxiques pour la lutte directe contre les ravageurs et les maladies agricoles (Kashif et al., 2022).

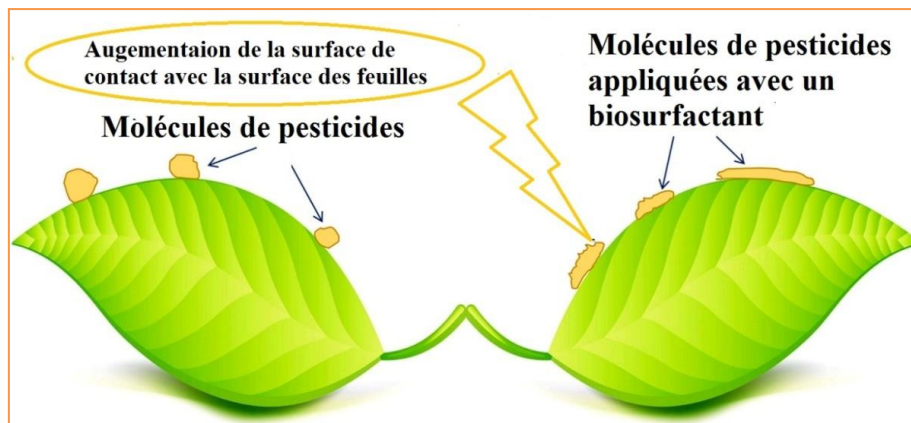


Figure 12 : Schéma de l'influence du biosurfactants sur le rôle des pesticides en agriculture (Kashif et al., 2022).

I.4.4. En médecine

De nombreux biosurfactants ont des applications potentielles dans les activités antimicrobiennes (antipaludéen, antifongique et antiviral) et immunomodulatrices, ainsi qu'en tant qu'agents adhésifs et antiadhésifs, et comme adjuvants significatifs pour les antigènes dans les vaccins et la thérapie génique (Rodrigues et al., 2006 ; Varjani et al., 2020).

Les biosurfactants ont été rapportés comme ayant diverses utilisations médicales sont présentées dans la Figure 13 (Inamuddin et al., 2019).

L'utilisation de biosurfactants à des fins médicales a des effets à la fois positifs et négatifs. Les biosurfactants tels que les rhamnolipides ont été trouvés pour avoir des propriétés antimicrobiennes et anti-tumorales, mais leur production est liée à la pathogénicité des *Pseudomonas*, même chez les plantes. Par conséquent, il faut faire preuve de prudence lors de l'utilisation de tels biosurfactants en raison des réactions allergiques potentielles et des irritations cutanées causées par des biosurfactants spécifiques provenant de pathogènes dans les produits cosmétiques ou de soins de santé (Haque et Hassan., 2020).

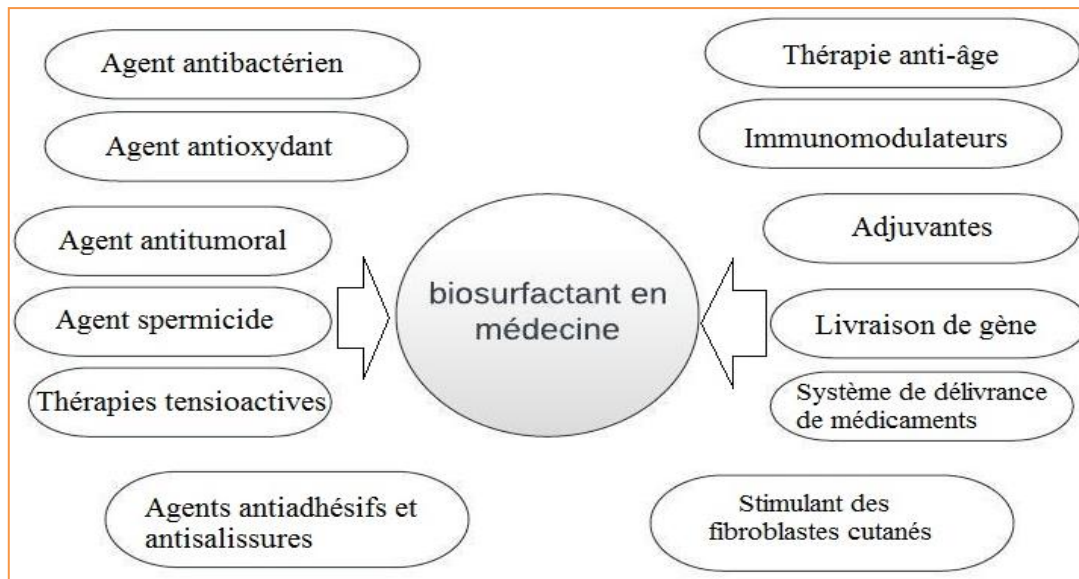


Figure 13: Principales applications des biosurfactants dans le domaine de la médecine (Inamuddin et al., 2019).

I.4.5. Dans les cosmétiques

Les biosurfactants sont largement utilisés dans l'industrie cosmétique et de la santé en tant que détergents, émulsifiants et stabilisateurs. En raison de leur faible toxicité et de leur biodégradabilité élevée, ils sont présents dans de nombreux produits de première nécessité tels que les shampooings, les dentifrices, les savons, les crèmes pour le corps, les lotions et les hydratants (Yea et al., 2019 ; Vecino et al., 2017).

Les biosurfactants sont couramment utilisés comme émulsifiants pour stabiliser les émulsions dans diverses formulations cosmétiques. Des études ont démontré leur utilisation sécuritaire dans les crèmes hydratantes pour peaux sèches et les crèmes anti-âge (Vecino et al., 2017).

De même, l'irritation de la peau est le facteur le plus courant causé par les cosmétiques en raison des tensioactifs chimiques, qui peuvent être remplacés par des biosurfactants ayant une activité antimicrobienne élevée. Les propriétés prolifératives et hygroscopiques des biosurfactants les aident à interrompre le métabolisme des fibroblastes dermiques et à prévenir la formation de radicaux libres qui peuvent endommager la peau (Kashif et al., 2022).

La vitamine C est un nutriment essentiel pour la santé humaine, qui joue un rôle important dans la production de collagène et la protection de la peau. Cependant, elle est facilement dégradable, et les industries cosmétiques et pharmaceutiques contiennent de la vitamine C déshydratée dans leur formulation pour éviter sa dégradation. Il doit être réhydraté avant utilisation, ce qui entraîne un processus fastidieux (Rincón-Fontán et al., 2020).

La plupart des produits cosmétiques à base de vitamine C sont utilisés pour obtenir une peau plus jeune, mais sont très instables et sont souvent associés à des antioxydants. Pour l'augmentation de la stabilisation de la vitamine C dans les solutions aqueuses, l'utilisation de biosurfactant a été concluante, la Figure 14 présente la stabilisation de vitamine C par un biosurfactant (Chambial., 2013).

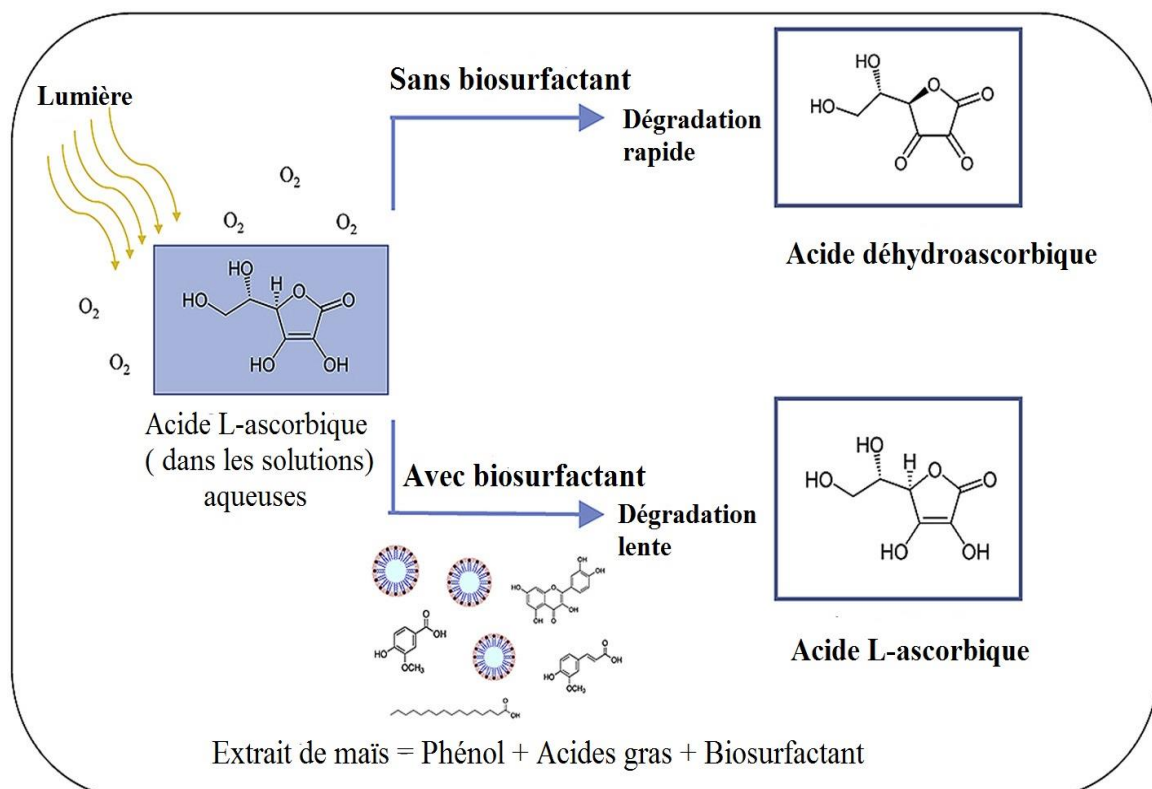


Figure 14 : Stabilisation de la vitamine C par un Biosurfactant (Rincón-Fontán et al., 2020).

I.4.6. Dans l'industrie pharmaceutique

Les biosurfactants, en raison de leur capacité à mélanger des formulations hydrophobes, ont trouvé des applications dans l'industrie pharmaceutique, notamment dans la livraison de médicaments, ainsi que dans les processus de mélange et de formulation (Naughton et al., 2019 ; Ohadi et al., 2020).

Les auteurs ont examiné les fonctions et les applications des biosurfactants en tant que micro-émulsions dans les systèmes de délivrance de médicaments (MDDS). Ils ont souligné que l'analyse approfondie de la nature hétérogène des biosurfactants est nécessaire pour optimiser leur utilisation dans les systèmes améliorés de délivrance de médicaments (Ohadi et al., 2020).

I.4.7. Dans l'environnement

Les biosurfactants, en raison de leurs propriétés amphiphiles, peuvent former des micelles stables, augmentant ainsi la disponibilité des hydrocarbures et du pétrole brut pour la biodégradation, ce qui améliore la santé des sols et le traitement de l'eau. De plus, les biosurfactants peuvent influencer la précipitation des nuages en modifiant la tension de surface des gouttelettes d'eau, et ils sont également reconnus comme des contributeurs importants à la dégradation des xénobiotiques chez les organismes benthiques (Markande et al., 2021).

Les potentiels et les pièges des biosurfactants (rhamnolipides, sophorolipides et surfactines) produits par *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Candida* pour la bioremédiation des déversements d'huile ont été analysés. Les biosurfactants modifient la tension de surface des aérosols, affectant la précipitation. Ils sont également utilisés pour améliorer la bioremédiation et sont considérés comme une approche moderne en nano-biotechnologie pour le traitement des sols et de l'eau (Markande et al., 2021).

Chapitre II

II. Processus de production des biosurfactants

II.1. La sélection d'organismes

L'isolement et la caractérisation des organismes qui produisent des biosurfactants occupent une part importante de la littérature sur les biosurfactants. La bio-prospection est le processus de collecte de souches dans leurs habitats naturels afin de les isoler et de les étudier en laboratoire. La sous-culture implique souvent un enrichissement avec la cible de bioremédiation (comme les contaminants hydrocarbonés) via une succession de dilutions (Pott et Von Johannides, 2022).

La coloration de Gram, la motilité, la forme, la sensibilité à la catalase (ou autre enzyme) et d'autres tests, si nécessaire, sont effectués sur des souches qui utilisent efficacement le composé d'intérêt, de préférence comme seul carbone et source d'énergie, et qui atteignent la densité cellulaire la plus élevée à une certaine DO (densité optique). Les isolats qui produisent des niveaux plus élevés de biosurfactants avec des propriétés d'émulsification (ou de déplacement d'huile), ainsi qu'un taux de croissance acceptable (Figure 15), sont susceptibles d'attirer l'attention pour des applications telles que la bioremédiation, le contrôle biologique ou l'application pharmaceutique (Pott et Von Johannides, 2022).

Une fois qu'un organisme prometteur a été identifié, il doit être séquencé (Figure 15), les voies connues de production de biosurfactants doivent être recherchées dans la séquence et le surfactant doit être analysé par GC-MS ou d'autres techniques analytiques avancées (Pott et Von Johannides, 2022).

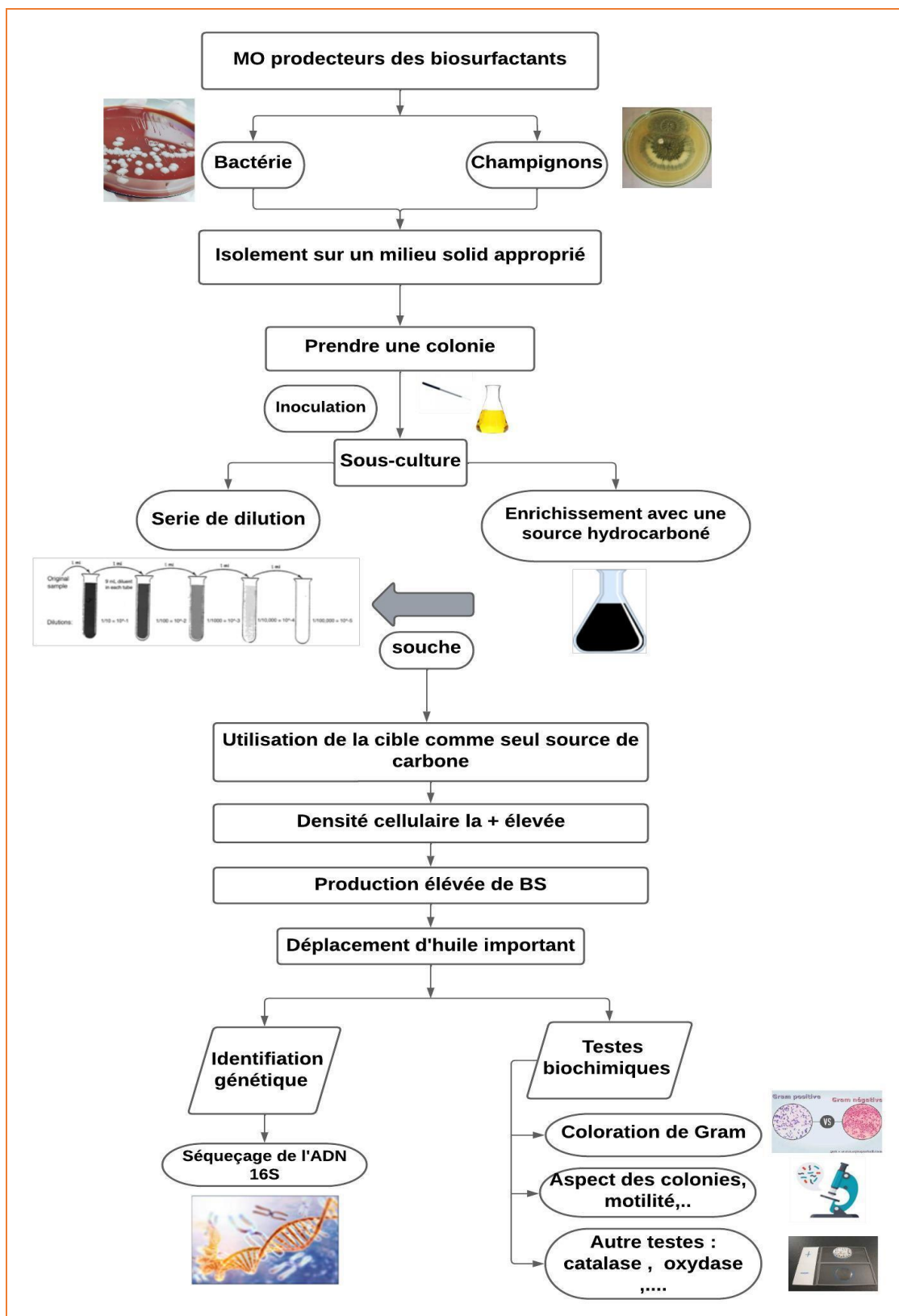


Figure15: Schéma représentant les différentes étapes d’isolement, de caractérisation et d’identification des souches productrices des biosurfactants (Shilpa, 2021 avec modification).

MO : microorganismes , + : plus ; BS : Biosurfactants.

II.2. Modification génétique/sélection de la souche

Certains microorganismes peuvent produire du BS tout en dégradant les hydrocarbures et autres sources de carbone (Aslam et al., 2023). Ce comportement peut être le résultat de l'induction des gènes ou d'enzymes spécifiques qui sont activés en présence de composés d'hydrocarbures (Jimoh et Lin, 2019 ; Vieira et al., 2021). Étant donné que la génétique du microorganisme producteur influence le rendement de BS, l'ingénierie génique dans ces microorganismes est un autre moyen d'obtenir de meilleurs rendements et de réduire les coûts, en plus de changement des paramètres de fermentation (Manga et al., 2021 ; Vieira et al., 2021).

L'ingénierie génétique est la modification du matériel génétique microbien, en vue d'acquérir des capacités de production nouvelles ou améliorées, présentant un intérêt biotechnologique et environnemental (Jimoh et al., 2021). La substitution, le remplacement et la modification des acides aminés, Calcul *in silico* pour la découverte de nouvelles voies métaboliques, Prospection biologique utilisant un criblage à haut débit (bioprospecting using high throughput screening), Prospection génomique (genome mining), Criblage métagénomique, knock-out de gène (gene/gene cluster knock-out), Surexpression de peptides extracellulaires, la technologie de l'ADN recombinant, et la mutagenèse sont des techniques d'ingénierie génétique typiques utilisées dans la production des BS (Manga et al., 2021 ; Jimoh et al., 2021).

Il existe plusieurs stratégies pour modifier génétiquement les microorganismes producteurs des biosurfactants (Tableau 02). La mutation qui se produit sur le site de l'ADN est aléatoire dans la mutagenèse aléatoire. Dans la mutagenèse dirigée, les mutations sont effectuées à des endroits prédéterminés (Udayangani, 2018). Grâce à la technologie de l'ADN recombinant, les gènes responsables de la synthèse des biosurfactants peuvent être clonés puis insérés dans le génome du microbe, ce qui entraîne une augmentation de la production de biosurfactants (Figure 16).

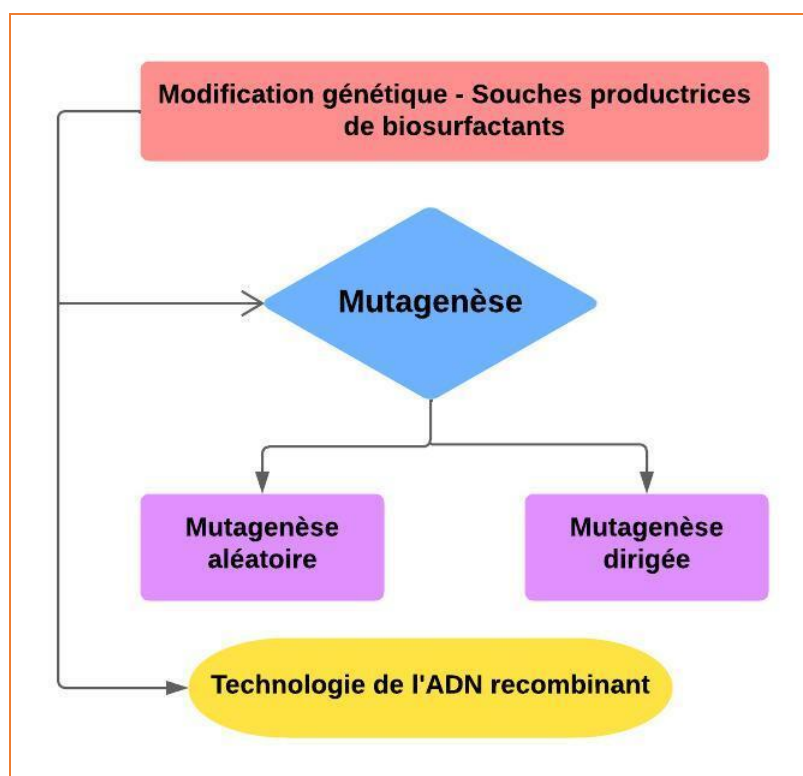


Figure 16: Représentation schématique de quelques stratégies d'ingénierie générique impliquées dans la production de biosurfactants (Ambaye et al., 2021).

La capacité de produire des congénères efficaces (une combinaison de bioproduits étroitement liés), des procédés de production novateurs et durables de biosurfactants, la possibilité d'augmenter les rendements de la production BS et, dans certains cas, la résistance aux conditions de processus extrêmes. Tous ceux-ci doivent être démontrés par les producteurs de BS génétiquement modifiés afin d'être considérés comme réussis (Aslam et al., 2023).

Les applications industrielles et biotechnologiques des souches hyper-productives recombinantes et génétiquement améliorées ne sont pas bien établies, bien que plusieurs hyper-producteurs de BS aient été documentés dans la littérature (Manga et al., 2021 ; Jimoh et Lin, 2019). Un certain nombre d'études ont été effectuées pour combler cet écart.

L'utilisation des méthodes *in silico* et l'abondance d'informations sur les processus métaboliques ne cessent de croître, ce qui contribue à l'amélioration du développement des souches productrices des BS (Aslam et al., 2023). En outre, grâce à l'identification de cibles potentielles pour la surexpression par l'analyse de génomes entiers et de profils

transrationnels, le processus de génie génétique est devenu moins long et plus efficace (Manga et al., 2021).

Tableau 02 : Quelques stratégies utilisées pour modifier génétiquement les micro-organismes producteurs des BS adapté par Aslam et al., 2023.

Microorganismes	Stratégie	Biosurfactants	Références
<i>Acinetobacter calcoaceticus A2^a</i>	Mutagenèse	Biodispersan	(Calvo et al., 2009)
<i>Bacillus subtilis^a</i>	Amélioration de la synthèse des biosurfactants grâce à l'ingénierie métabolique	Surfactine	(Wu et al., 2019)
	Substitution de promoteur natif		(Jung et al., 2012)
	Surexpression de peptides spécifiques de signalisation extracellulaire.	Lipopeptide	(Willenbacher et al., 2016)
<i>B.subtilis SK320^a, Paenibacillus sp. D9^a</i>	Clonage des gènes des biosurfactants	Lipopeptide	(Jimoh et Lin, 2019b) ; (Sekhon et al., 2011)
<i>Bacillus licheniformis^a</i>	Remplacement du promoteur natif de l'opéron de synthèse des biosurfactants	Lichenysin	(Qiu et al., 2014)
	Expression hétérologue des gènes de synthétase de la surfactine	Surfactine	(Anburajan et al., 2015)
<i>Rhodococcus erythropolis SB-1A^a</i>	Mutagenèse aléatoire avec rayonnement ultraviolet	Glycolipides et lipopeptides	(Cai et al., 2016)
<i>Paenibacillus sp.^a</i>	Clonage des gènes de biosurfactants pour produire une souche recombinante hyper-productive	Surfactine	(Jimoh et Lin, 2019a)
<i>Pseudozyma hubeiensis^b</i>	la mutagenèse	lipides de mannosylerythritol	(Konishi et Makino, 2018)

^a Bactérie ; ^b levure.

II.3. Les stratégies de fermentation

Il n'y a pas eu de méthode constante appliquée en matière de stratégies de fermentation pour la production de biosurfactants. Des procédés en batch, en Fed-batch et en continu (Figure 17) ont été rapportés (Kosaric et Sukan, 2014).

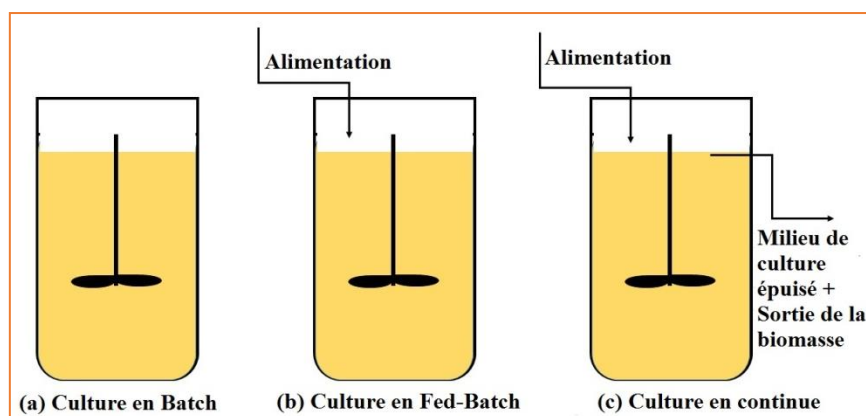


Figure 17: Représentation schématique des différents types des stratégies de fermentations (Chandrasekharan, 2020).

II.3.1. Culture en Batch

Il n'est pas possible de contrôler la quantité de substrats dans le bioréacteur ou le taux de croissance au fil du temps dans les stratégies de fermentation en batch (Figure 17a). Néanmoins, des stratégies en fed-batch basées sur l'heuristique ont été appliquées à la production de rhamnolipides en raison de la régulation complexe de la production de rhamnolipides combinée à des systèmes de détection de densité cellulaire, résultant en une production comparable aux procédés en batch (Kosaric et Sukan, 2014).

Outre la fermentation en discontinu, des procédés séquentiels en batch sont également utilisés dans la production de biosurfactants (Pornsunthorntawee et al., 2009).

II.3.2. Culture en Fed-Batch

L'utilisation de stratégies d'alimentation Fed-batch (Figure 17b) permet de contrôler les concentrations de substrats et le taux de croissance en régulant l'alimentation en nutriments. Cette approche peut mener à des stratégies de processus efficaces qui permettent d'obtenir des quantités importantes de biosurfactants par fermentation (Kosaric et Sukan, 2014).

II.3.3. Culture en continu

La fermentation continue (Figure 17c) est la troisième stratégie, qui est utilisée dans la production de surfactine et de rhamnolipides. Différents systèmes ont été développés pour ces cultures continues, avec des taux de dilution relativement bas, allant de $0,065 \text{ h}^{-1}$ pour les rhamnolipides à $0,1$ à $0,2 \text{ h}^{-1}$ pour une production optimale de biosurfactants (Kosaric et Sukan, 2014).

II.4. Type et fonctionnement du réacteur

Le bioréacteur qui peut être utilisé dans un processus est déterminé par le type, la taille, la forme et les besoins métaboliques de l'organisme. La plupart du travail a été fait pour des cultures aérobies, submergées, planctoniques (Marcelino et al., 2020), où les fermentations sont faites dans des récipients à température, oxygène et agitation contrôlés (Rangarajan et Clarke, 2015).

Les réacteurs à biosurfactants prennent différentes configurations, les CSTR (Réacteurs à cuve agitée en continu) étant les plus courants (Figure 18), et peuvent être opérés dans des stratégies de fermentation batch, fed-batch et continue (Kosaric et Sukan, 2014 ; Pott et Von Johannides, 2022).

Cependant, les CSTRs normalement aérées sont difficiles à utiliser en raison du coût de la ventilation et de l'agitation, de la stérilisation avant et après la fermentation et d'une mousse excessive. L'épuisement de l'oxygène peut se produire dans les régions d'un réacteur où la concentration des cellules métaboliques est trop élevée, ce qui réduit la productivité en volume du réacteur (Jiang et al., 2020 ; Pott et Von Johannides, 2022).

Des géométries de réacteurs modifiées ont été proposées pour contourner certains de ces problèmes et augmenter la productivité (Pott et Von Johannides, 2022).

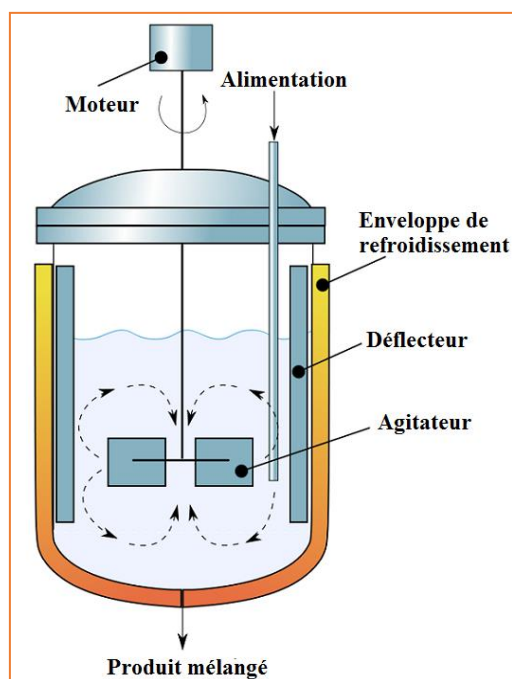


Figure 18: Schéma représentant la construction de base d'un réacteur CSTR (Cunningham, 2015).

II.4.1. Réacteur de fractionnement de mousse

La mousse est un problème courant dans les méthodes traditionnelles de culture des biosurfactants et peut même causer l'échec des fermentations. Pour résoudre ce problème, des agents de rupture de mousse sont appliqués de manière régulière, tels que des produits chimiques anti-mousse ajoutés au bouillon de fermentation, ou des brise-mousse mécaniques dans l'espace de tête (Pott et Von Johannides, 2022).

Des réacteurs basés sur cette idée ont été développés (Figure 19) et fonctionnent sur ce concept, il s'agit de réacteurs de fractionnement de mousse (Burghoff, 2012). La procédure sépare les composés ayant une faible activité de surface de ceux ayant une activité supérieure élevée, de sorte que la mousse collectée est riche en biosurfactants et peut être transportée pour plus de transformation.

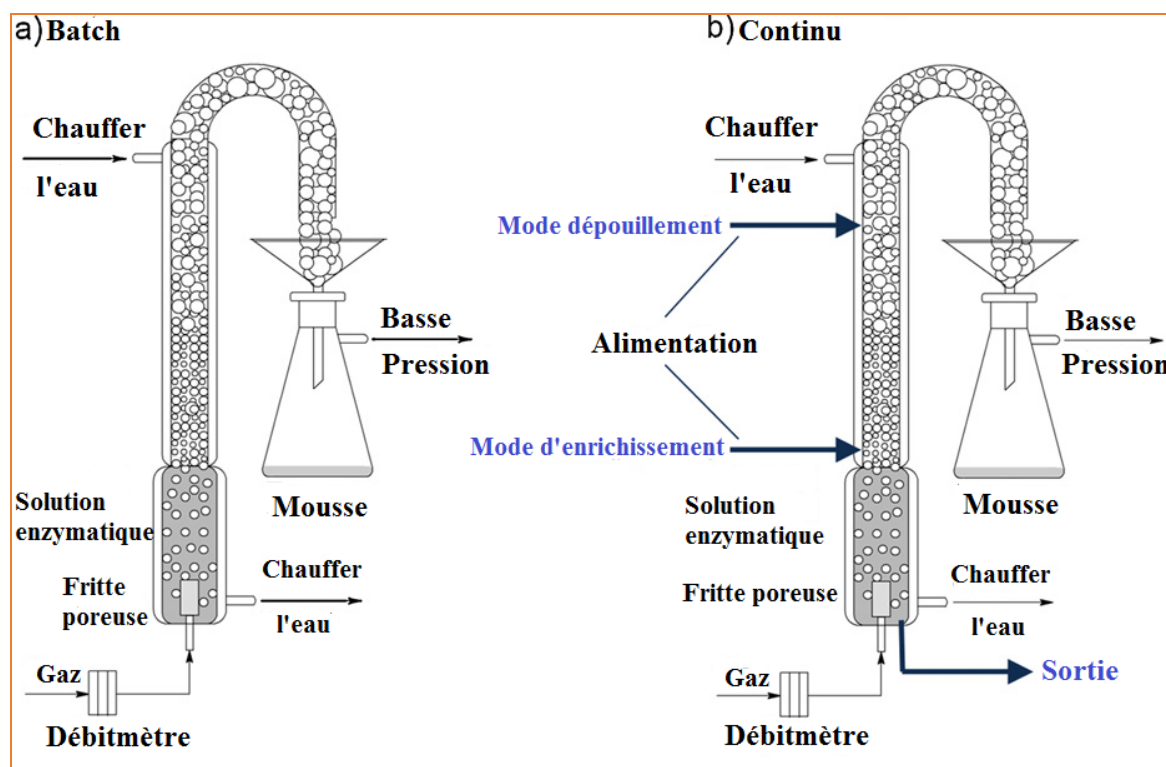


Figure 19: Schéma d'une configuration expérimentale pour le fractionnement de la mousse (a) en mode batch et (b) en mode continu (Burghoff, 2012).

Un problème majeur avec cette méthode est que de nombreux composants de milieux de culture dans la fermentation des biosurfactants ont également une propriété hydrophobe. Cela signifie qu'ils se déplacent également vers la mousse, ce qui les retire du volume de réaction. Si la mousse est épuisée en produit et ensuite recyclée, ou si les cellules sont conservées dans le réacteur et ne se déplacent pas à l'interface gaz-liquide, ces préoccupations peuvent être résolues. L'immobilisation et les biofilms sont des méthodes efficaces pour ce faire (Pott et Von Johannides, 2022).

II.4.2 Réacteurs à membrane

Les fermentations de biosurfactants peuvent inclure les membranes (Figure 20) de deux façons principales (Coutte et al., 2017) : (1) en utilisant la membrane pour maintenir la biomasse active à l'intérieur du réacteur tout en retirant le milieu riche en produits ou épuisé par le substrat à travers la membrane; et (2) en employant la membrane pour oxygéner le récipient de réaction. Les études sur la production de biosurfactants ont plus souvent prouvé la deuxième configuration avec moins de travail montrant qu'une membrane peut être utilisée pour retenir les cellules produisant des biosurfactants (Pott et Von Johannides, 2022).

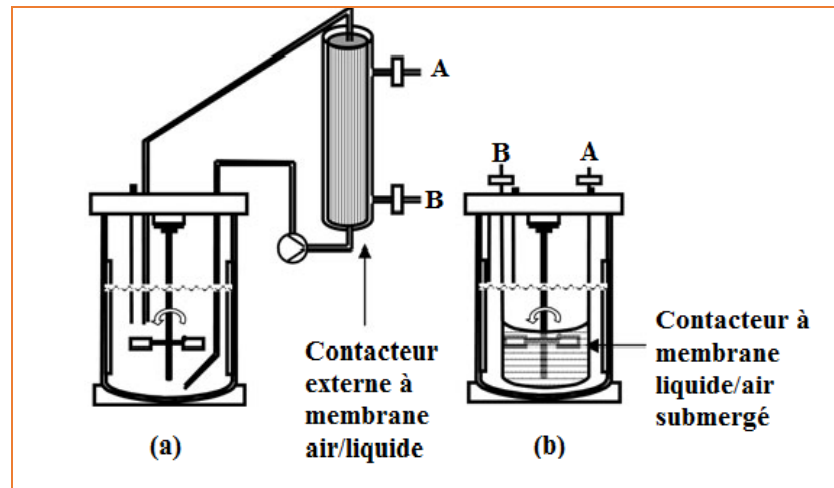


Figure 20 : Représentation schématique des bioréacteurs utilisés pour la production de lipopeptides par *B. subtilis*. Bioréacteur sans bulles (a) utilisant un module externe de membrane en fibre creuse, bioréacteur sans bulles (b) utilisant une membrane en fibre creuse submergée. A entrée d'air, B sortie d'air (Coutte et al. 2010).

L'excès de mousse dans un réacteur à barbotage (Sparged réacteur) est un problème d'exploitation crucial dans la fabrication de biosurfactants. L'utilisation d'une membrane pour l'oxygénation est une approche possible, mais cela nécessiterait une grande surface de la membrane et une pression partielle élevée de l'oxygène. En outre, les membranes sont coûteuses, fragiles et susceptibles d'être entravées par les organismes qui poussent sur leur surface (Pott et Von Johannides, 2022).

Il y a certainement encore beaucoup de travail à faire sur ce sujet, à la fois en termes d'oxygénation à base de membrane et de rétention cellulaire basée sur la membrane, malgré le fait que ces réacteurs ont montré un potentiel considérable (Pott et Von Johannides, 2022).

II.4.3. Bioréacteurs à boues

Le plus souvent, des réacteurs de boue (Figure 21) ont été appliqués dans le traitement des sols pollués par des pétrochimies (Robles-González et al., 2008). La production de biosurfactants n'est pas l'objectif de ces procédures ; au contraire, des organismes producteurs de biosurfactants sont utilisés dans la bioremédiation des sols pollués (Singh et al., 2017).

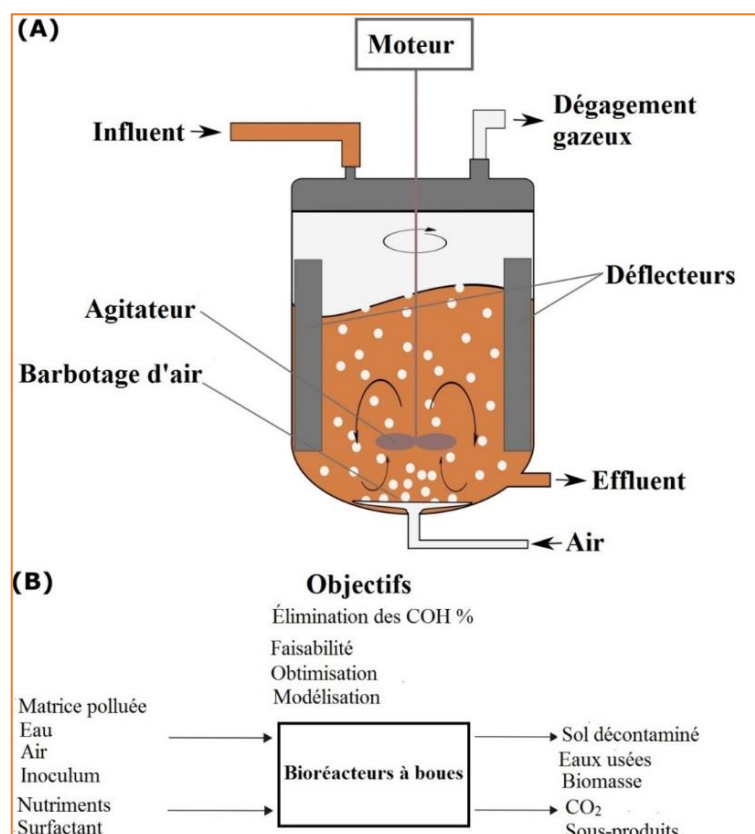


Figure 21 : Technologie des bioréacteurs à boue : (a) Configuration typique (b) les objectifs et éléments nécessaires pour le fonctionnement d'un réacteur à boues (Pino-Herrera et al., 2017).

Par conséquent, ces réacteurs nécessitent un mélange de sol, de milieu de croissance, d'oxygène et de micro-organismes souvent injectés pour fonctionner. Bien que cette étude soit bénéfique et significative, elle ne devrait pas conduire à une stratégie rentable pour produire de grandes quantités de biosurfactants pur (Pott et Von Johannides, 2022).

II.4.4. Fermentation à l'état solide

La fermentation à l'état solide (Figure 22) repose sur l'emploi d'une phase de substrat solide, souvent un déchet agricole (Das et Kumar, 2018) ou un autre substrat à faible valeur (Costa et al., 2018), qui est inoculé avec l'organisme souhaité et maintenu dans des conditions de croissance convenable. Le plus souvent, une fermentation discontinue est utilisée, puis le produit est extrait du solide par solubilisation dans un solvant sélectif, ce qui met fin à la fermentation (Pott et Von Johannides, 2022).

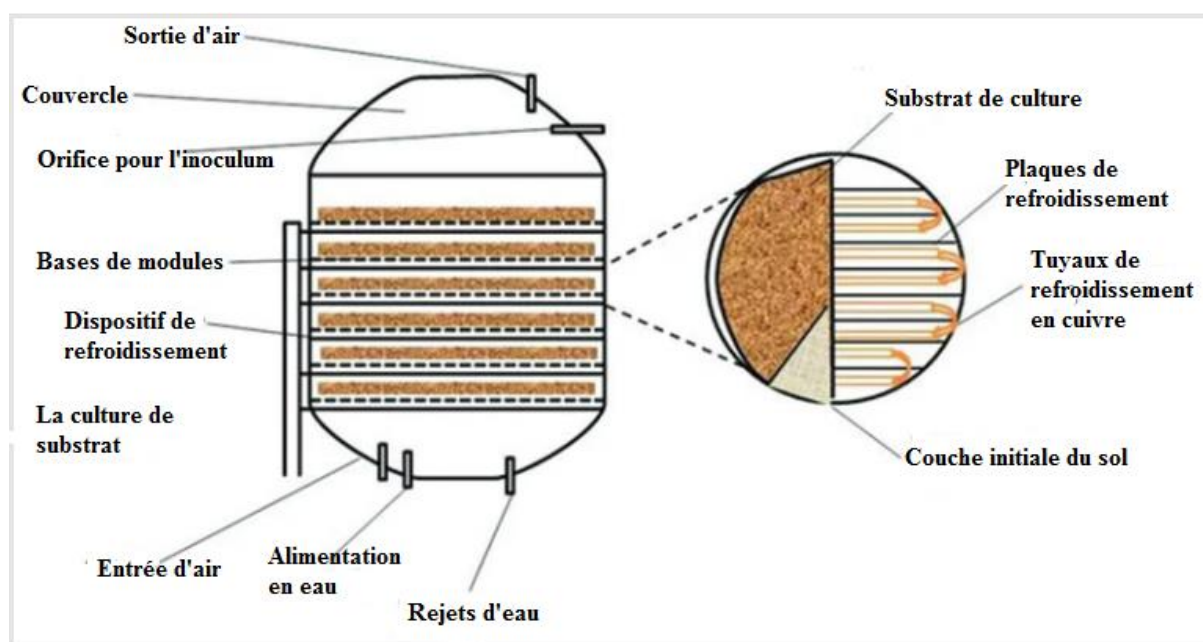


Figure 22: Schéma du fermenteur à l'état solide pour la conversion de la biomasse lignocellulosique en enzymes (Ravindran et Jaiswal, 2016).

La mousse n'est pas un problème lors de la fermentation à l'état solide car il y a si peu de liquide présent, et l'oxygénation est réalisée simplement en faisant passer de l'air sur le substrat solide. En outre, la méthode réduit les coûts des opérations de culture submergée telles que l'agitation, la gestion de la composition de liquide et le barbotage (Costa et al., 2018).

II.4.5. Réacteurs à base de cellules immobilisées ou de biofilms

Plusieurs espèces productrices de biosurfactants ne forment pas de biofilms ; par conséquent, une approche alternative de rétention de la biomasse est nécessaire, c'est le cas des cellules immobilisées (Figure 23). Le piégeage des cellules dans une matrice solide est une approche qui est souvent utilisée en biotechnologie. Cette matrice, souvent sous la forme de billes millimétriques, peut alors être maintenue à l'intérieur du réacteur tout en permettant au milieu de s'écouler (Pott et Von Johannides, 2022).

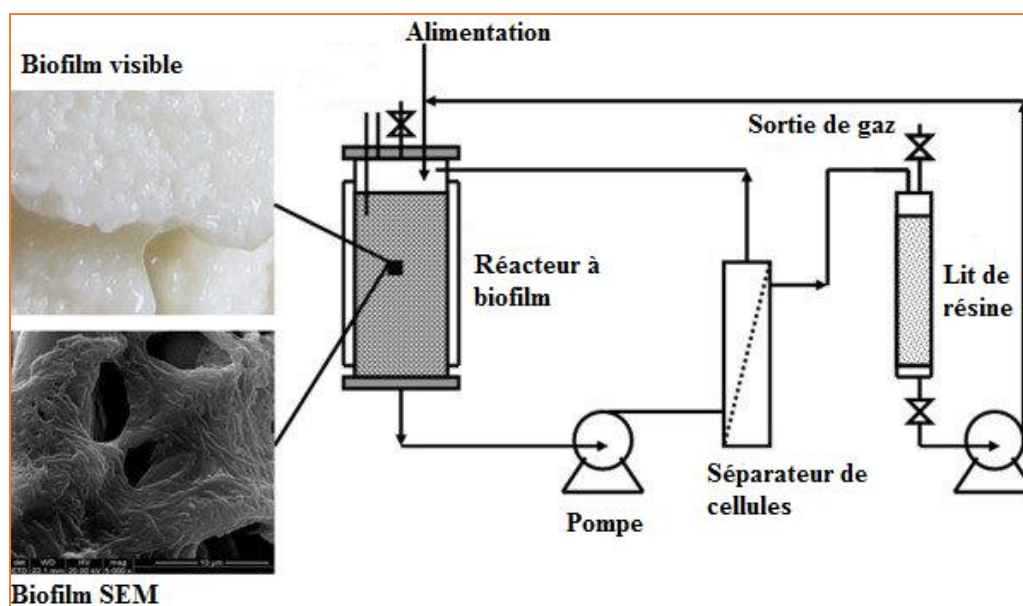


Figure 23: Schéma du réacteur de biofilm couplé à l'adsorption en lit fixe (Liu et al., 2014).

Cette approche permet de séparer le temps de rétention hydraulique du temps de rétention des solides, permettant ainsi des stratégies opérationnelles continues. Cependant, il y a des limites potentielles en termes de transfert de masse des substrats dans les perles, qui peuvent affecter la productivité (Pott et Von Johannides, 2022).

L'approche d'immobilisation peut également aider à éviter toute formation de mousse en minimisant le besoin d'oxygène d'aération. Elle peut conduire à des changements significatifs dans la biologie des organismes fermenteurs, ce qui peut augmenter le rendement. Les cellules immobilisées peuvent également être recyclées, mais il existe des limites de diffusion qui peuvent affecter la productivité (Abouseoud et al., 2008 ; Pott et Von Johannides, 2022).

II.4.6. Bioréacteur à disque rotatif

Les bioréacteurs à disques rotatifs (Figure 24) sont une configuration spécifique d'un réacteur à biofilm qui diffère de la plupart des autres configurations en termes de composants mobiles et de leur contact air-liquide. Les disques rotatifs servent de supports solides dans cette configuration, et ils alternent entre le milieu de croissance et la phase gazeuse au fur et à mesure que la biomasse sur eux se développe dans un biofilm.

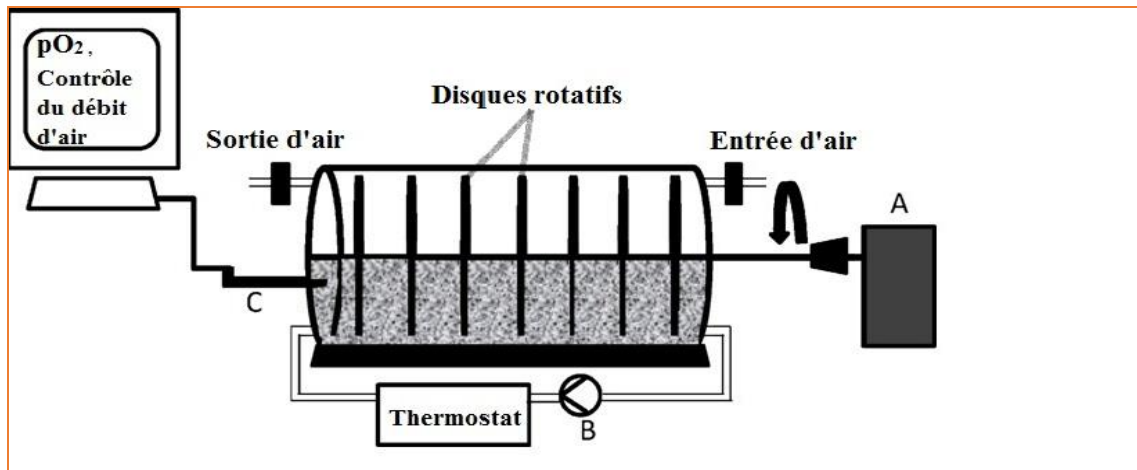


Figure 24 : Représentation schématique du bioréacteur à disques rotatifs et du dispositif expérimental, A : *moteur rotatif* ; B : *pompe péristaltique* ; C : *sonde à oxygène dissous* (Chtioui et al., 2012).

Cette configuration est utile lorsqu'un processus continu ou semi-continu doit être utilisée, car elle minimise l'excès de mousse et permet au produit biosurfactants de s'accumuler dans le milieu liquide. Cependant, il existe des restrictions sur la quantité de biomasse pouvant être utilisée dans ces réacteurs en raison de la taille du disque. En outre, les organismes qui ne forment pas naturellement des biofilms ne peuvent pas être utilisés avec cette technologie à moins qu'ils ne soient génétiquement modifiés (Pott et Von Johannides, 2022).

II.4.7. Réacteurs d'extraction *in situ*

En utilisant une séparation de phase liquide-liquide (Figure 25), Dolman et ces collaborateurs ont créé un réacteur qui sépare une phase riche en sophorolipides d'une phase riche en cellule. Ce réacteur comporte un volume de décantation *in situ* destiné à la décantation par gravité des deux phases, permettant de collecter en continu le produit et de recycler le milieu de fermentation (Dolman et al., 2019).

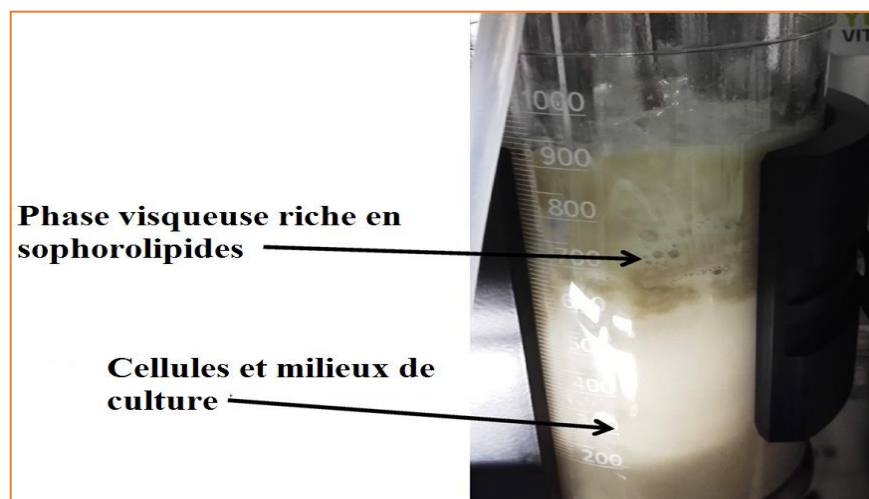


Figure 25: Accumulation de produits sophorolipides et hétérogénéité du bioréacteur au cours de la fermentation (Dolman et al., 2019).

Cette étude attire l'attention sur un problème lié à l'utilisation de systèmes d'extraction in situ pour fabriquer des biosurfactants. Étant donné que la plupart de ces fermentations de biosurfactants impliquent une phase d'huile non miscible en tant que substrat, Et donc, un système d'extraction de solvants (la méthode d'exploitation in situ la plus couramment utilisée) ne serait pas appropriée pour la fermentation des biosurfactants (Pott et Von Johannides, 2022).

II.5. Facteurs influant sur la production de biosurfactants

Une production rentable et accrue de biosurfactants est une nécessité dans l'ère actuelle. Par conséquent, l'optimisation de la production de biosurfactants est toujours une préoccupation pour diverses industries (Ahamed et Prasad, 2021).

II.5.1. L'effet de sel et salinité

Dans la synthèse des biosurfactants, la salinité d'un milieu donné est également importante (Aslam et al., 2023). La production de biosurfactants la plus élevée a été obtenue à 3% (p/v) de NaCl, et en présence de 12 % (p/v) de NaCl, il a conservé près de 80 % de son activité (Khopade et al., 2012). En d'autres termes, la présence de concentrations plus élevées de sel n'a pas réduit de manière significative l'efficacité du biosurfactants.

II.5.2. Le pH

Le pH des solutions aqueuses joue un rôle important dans les caractéristiques anioniques des molécules de rhamnolipide en raison de la présence de groupes carboxyle. À

un pH de 6,8, la majeure partie des groupes carboxylés se dissout dans une solution à pH 5 (Özdemir et al., 2004).

Les variations du pH altèrent la structure chimique des biosurfactants, ce qui entraîne des comportements différents (Aslam et al., 2023). Il est possible que les biosurfactants de rhamnolipide se solubilisent davantage dans des conditions alcalines, ce qui entraîne une libération excessive de protéines et de glucides, augmentant ainsi la perméabilité cellulaire (Luo et al., 2013).

II.5.3. L'aération et l'agitation

L'aération et l'agitation jouent un rôle essentiel dans la production de biosurfactants en facilitant l'échange d'oxygène entre le gaz et le liquide, ainsi que la fourniture d'oxygène dissous et le transfert de masse pendant la fermentation (Ahamed et Prasad, 2021 ; Aslam et al., 2023). Un mélange et une aération vigoureuse peuvent conduire à un moussage excessif et une fermentation instable, ils doivent donc être optimisés (Ahamed et Prasad, 2021).

II.5.4. Source de carbone

L'apport de carbone dans le milieu de culture est essentiel pour les bactéries qui produisent des biosurfactants (Aslam et al., 2023), puisque la nature de substrats affecte la qualité et la quantité de la production des biosurfactants (Murad, 2012). Les huiles végétales, les hydrocarbures, et les hydrates de carbone sont les trois groupes de sources de carbone utilisées pour la production des biosurfactants (Varjani et Upasani, 2017 ; Nurfarahin et al., 2018).

Les huiles de friture, les débris de fruits et de légumes et les mélasses ne sont que quelques-uns des nombreux ingrédients potentiels pour la production des biosurfactants (Domínguez Rivera et al., 2019). Il est évident que les substrats de carbone jouent un rôle crucial dans la synthèse des biosurfactants, mais leur importance varie en fonction de la forme de vie (Aslam et al., 2023).

II.5.5. Source d'azote

La production de biosurfactants nécessite la présence d'azote (Aslam et al., 2023). La synthèse des protéines et des enzymes l'exige, d'où son importance cruciale pour le développement microbien (Murad, 2012). Différentes sources d'azote inorganique (le nitrate de potassium, le chlorure d'ammonium et le nitrate de sodium) et organique (l'urée, les

peptones et la levure) peuvent être utilisées pour la production de biosurfactants (Aslam et al., 2023).

Les molécules complexes d'azote organique sont choisies parce qu'elles n'induisent pas un changement de pH important (Aslam et al., 2023). Comme ils peuvent hydrolyser des cations ou des anions et modifier le pH du milieu de culture, l'utilisation de sels inorganiques peut réduire l'efficacité de la fermentation (Santos et al., 2016). Les dépenses de fabrication peuvent être réduites en utilisant des déchets au lieu de sources d'azote commerciales plus coûteuses (Aslam et al., 2023).

II.5.6. Rapport carbone/azote (C/N)

Le développement des biosurfactants est affecté non seulement par le type d'azote utilisé par les microorganismes, mais aussi par le rapport carbone/azote (C/N) dans la fermentation (Gurkok, 2021). En général, la synthèse de biosurfactants ne se produit que lorsque la source d'azote est épuisée au cours de la phase de croissance cellulaire et que le milieu de culture présente un rapport C/N élevé (10-40) (Aslam et al., 2023).

II.6. Composition des milieux de culture

Deux raisons clés ont poussé vers l'utilisation de sources de carbone alternatives dans la fabrication de biosurfactants. Tout d'abord, l'utilisation de substrats moins chers améliorera l'économie car la source de carbone est un facteur de coût majeur dans la production (Pott et Von Johannides, 2022).

L'utilisation de déchets (tableau3) comme substrat peut présenter des contraintes : tout d'abord, leur composition peut varier, ce qui nécessite un traitement supplémentaire pour éliminer les composants contaminants. De plus, il peut y avoir une résistance du marché en fonction de l'utilisation finale des biosurfactants (Pott et Von Johannides, 2022).

La sélection des substrats pour la production de biosurfactants est souvent motivée par le désir de limiter la variabilité des congénères, ce qui peut être réalisé en limitant la matière première à un seul acide gras (Delbeke et al., 2016) ou en contrôlant la distribution des congénères (Zhang et al., 2014 ; Ndlovu et al., 2017). Cette stratégie améliore la composition du produit et la variabilité d'un lot à l'autre, réduisant ainsi les coûts de traitement en aval et produisant un produit d'une pureté plus constante (Pott et Von Johannides, 2022).

Tableau 03 : Résumé de certains substrats clés de faible valeur utilisés pour la production de biosurfactants (Pott et Von Johannides, 2022).

Substrat		Biosurfactants produit	Références
Biomasse lignocellulosique	Lignocellulose	Rhamnolipides, sophorolipides, tréhalolipides, MEL	(Hrůzová et al., 2020)
	Bois ou papier hydrolysé	Rhamnolipides, lipopeptide	(Hrůzová et al., 2020)
Déchets alimentaires	Déchets de cuisine	Lipopeptides, biosurfactant, sophorolipides	(Wang et al., 2020)
	Mélasse	Biosurfactants	(Mouafo et al., 2018)
	Déchets de pommes de terre	Lipopeptides, rhamnolipides	(Das et Kumar, 2018)
	Résidus de poisson	Lipopeptide	(Martins et al., 2018)
	Farine de pépins de raisin	Lipopeptide	(Soussi et al., 2019)
	Déchets de brasserie	Lipopeptide	(Moshtagh et al, 2018) (Zhi et al., 2017)
	Petit lait	Biosurfactants	(Vera et al., 2018)
	Eaux usées de manioc	MEL	(De Andrade et al., 2017)
	L'eau de noix de coco	MEL	(Madihalli et al., 2020)
	Déchets d'ananas	Lipopeptides	(Falode et al., 2016)
Les huiles végétales	Effluent de l'huilerie de palme	Rhamnolipides	(Fazli et Hertadi, 2019)
	Huile de cuisson	Rhamnolipides, MEL, glycolipides, biosurfactants, lipopeptide, sophorolipides	(Jimoh et Lin, 2020)
	Déchets de biodiesel	Biosurfactants	(Sari et al, 2019)
	Déchets de moulin à huile	Rhamnolipides, lipopeptides, biosurfactant	(Lourenço et al., 2018)
	Gâteau à l'huile de coco	Rhamnolipides	(Samykanu et Achary, 2017)
	Tourteau de tournesol	Sophorolipides	(Jiménez-Peñalver et al., 2020)
	Glycérol	Sophorolipides, rhamnolipides	(Konishi et al., 2018)

La composition de milieux de culture doit tenir compte de différents facteurs, notamment l'azote, l'oxygène et les micronutriments. Cependant, l'environnement des milieux peut avoir des effets imprévisibles sur la productivité des biosurfactants, ce qui complique le contrôle des systèmes sensibles pour les ingénieurs en bio-processus qui opèrent une fermentation. Par conséquent, l'optimisation des milieux devrait donc être l'un des derniers facteurs à prendre en compte lors de l'élaboration d'un procédé (Pott et Von Johannides, 2022).

II.7. Extraction et identification des biosurfactants

Une combinaison d'approches classiques peut facilement récupérer la majorité du biosurfactants du milieu de culture (Sen et Swaminathan, 2005). Toutefois, lors de l'extraction, plusieurs types structuraux de biosurfactants cible sont souvent co-extraits avec un certain nombre d'impuretés qui sont produits en quantités variables. Pour les éliminer, il peut être nécessaire de les séparer et de les évaluer (Naser, 2015).

Avant d'extraire le bio-tensioactif du milieu de culture, il est essentiel de séparer les bactéries de ce dernier par centrifugation (Cherif, 2016). La charge ionique, la solubilité, la localisation (intracellulaire, extracellulaire), le coût de la récupération et de traitement en aval, et les propriétés physico-chimiques du biosurfactants cible sont tous des facteurs à prendre en compte lors de la décision d'une stratégie de purification et d'extraction des bio-tensioactifs (Shaligram et Singhal, 2010).

Il existe plusieurs méthodes de purification des biosurfactants et des bio-émulsifiants (tableau4), qui comprennent la précipitation, l'adsorption-désorption, la chromatographie d'échange d'ions, la centrifugation, la cristallisation, la filtration et la précipitation, le fractionnement par mousse, la focalisation isoélectrique, l'extraction par solvant, l'ultrafiltration et la dialyse (Satpute et al., 2010). Il est possible d'effectuer ces extractions directement ou après que les cellules productrices se soient sédimentées (Cherif, 2016).

Tableau 04 : Résumé des méthodes de séparation des biosurfactants avec leurs principes (Pott et Von Johannides, 2022).

Méthode	Mécanisme de séparation	Références
Décantation par gravité	Densité	(Dolman et al., 2017)
Adsorption	Adsorption	(Cheel et al., 2017)
Précipitation (acide, relargage ou solvant)	Solubilité (solide-liquide)	(Zhou et al., 2019)
Extraction par solvant	Solubilité (liquide-liquide)	(Kuyukina et Ivshina, 2019)
Filtration	Taille (de la molécule, du cristal et de la micelle)	(Bhaumik et al., 2020)
Fractionnement de la mousse	Hydrophobie	(Najmi et al, 2018)
Chromatographie (Colonne, CCM, gaz)	Vitesse de diffusion à travers le milieu (basée sur la taille, la charge, l'hydrophobicité, la liaison, la ligature, etc.)	(Jadhav et al., 2018)

Plusieurs techniques de précipitation sont couramment utilisées pour purifier les biosurfactants, y compris la précipitation à l'acétone et à l'éthanol (Rosenberg et al., 1979). La méthode de précipitation acide est une méthode simple, peu coûteuse et largement utilisée pour récupérer les biosurfactants bruts, tels que la surfactine, les lipopeptides et les glycolipides. Cette méthode consiste à effectuer une hydrolyse acide en abaissant le pH à l'aide de l'HCL concentré, ce qui rend le biosurfactants insoluble à un pH inférieur (Mukherjee et al., 2006).

Plusieurs méthodes de purification en série sont utilisées afin d'atteindre le degré de pureté requis. Bien que certaines des méthodes décrites puissent être utilisées à l'échelle industrielle, la plupart sont principalement utiles à l'échelle du laboratoire (Pott et Von Johannides., 2022).

Après la purification des produits (biosurfactants), il est nécessaire de déterminer leur structure (Cherif., 2016). Les analyses qualitatives les plus utilisées sont : la spectrométrie d'adsorption en lumière ultra-violette et visible (UV-Vis) pour détecter les chromophores (Spoeckner et al., 1999), la spectrométrie infrarouge pour identifier les groupements fonctionnels (Peypoux et al., 1999), Spectrométrie de masse (MS), qui offre le poids moléculaire, les indices structurels et les analyses élémentaires de la molécule à haute résolution, la RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) à haut champ pour déterminer la conformation des composés à analyser (Daniel et al., 1999).

Partie II :
Procédures expérimentales

Chapitre III

III. Matériel et méthodes

Ce travail a pour objectif l'étude de la production des biosurfactants en utilisant des bactéries pures issues d'une recherche antérieure sur le potentiel de biodégradation de pétrole brut par des bactéries hydrocarbonoclastes isolées des sédiments de l'oued Soummam et les propriétés chimio-biologiques de leurs biosurfactants.

La partie expérimentale de cette étude a été réalisée au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté d'Akli Mohand Oulhadj de Bouira. Ces bactéries sont testées pour leurs capacités à synthétiser des biosurfactants à travers une multitude de tests qualitatifs et quantitatifs en utilisant des déchets agro-industriels tels que : les pelures de banane, le lactosérum, l'huile de friture, les couilles d'œufs comme source de carbone alternative, dans le but de déterminer l'effet de ces derniers sur la production du biosurfactants.

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel biologique

Les souches (S1 et S2) soumises à cette étude ont été isolées des sédiments pollués de l'oued Soummam et elles ont été conservées sur gélose nutritive inclinées.

III.1.2. Matériel non biologique

L'Annexe N°01 détaille les différents équipements, l'appareillage, la verrerie et les réactifs, tandis que l'annexe N°02 énumère les différents milieux de culture qui ont été utilisés dans cette étude.

III.2. Méthodes

III.2.1. Revivification des souches

La revivification des souches bactériennes S1 et S2, conservées dans des tubes inclinés de gélose nutritive, a été réalisée à base d'un ensemencement solide-liquide dans des tubes contenant bouillon nutritif, puis incubés à 30 °C pendant 24 h. En suite un ensemencement liquide-solide a été fait sur des boîtes de Pétri contenant la GN. Les boîtes ont été incubées à 30 °C pendant 24 h (Figure 26). Ce milieu permet dans un premier temps d'activer les souches en vue de les repiquer plus tard sur d'autres milieux (Fonseca et al., 2007).



Figure 26 : Revivification des souches (Photo originale).

III.2.2. Vérification de la pureté des souches

La pureté des souches bactériennes a été vérifiée par la méthode des stries sur gélose nutritive. À l'aide d'une pipette pasteur, quelques colonies bactériennes ont été prélevées partir des souches revivifiées précédemment, elles ont ensuite été repiquées avec des stries serrées en surface de gélose nutritive, puis les boîtes ont été incubées à 37° C pendant 24 heures. Cette étape a été répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention de colonies identiques au sein d'une même boîte (Igbonekwu et al., 2014).

III.2.3. Etude des caractéristiques morphologique et biochimique des souches

III.2.3.1. Etude macroscopique des souches

Elle consiste à observer et décrire les colonies des souches S1 et S2 obtenues après leur ensemencement sur le milieu solide (GN). L'identification se fait à l'œil nu, elle se base essentiellement sur les caractères suivants : la forme, la taille, la couleur, l'opacité, l'élévation, l'aspect de la surface, la consistance et l'aspect du contour (Johnson et al., 1980).

III.2.3.2. Etudes microscopique des souches

L'étude microscopique des bactéries est une méthode essentielle pour caractériser ces microorganismes. Elle permet d'observer et de décrire leur forme, leur mobilité et leur mode d'association, ce qui fournit des informations importantes pour leur identification et leur classification (Derguine-Mecheri, 2019).

a. Coloration de Gram

Elle est une double coloration qui permet de caractériser et de classer initialement les bactéries. Elle met en évidence la forme, l'arrangement, la pureté et la nature biochimique de

la paroi cellulaire. Elle permet de distinguer deux grands groupes de bactéries : les bactéries Gram-positives avec une couleur violette et les bactéries Gram-négatives avec une couleur rose (Thairu et al., 2014). En utilisant les trois étapes suivantes :

Préparation du frottis

-La préparation du frottis a été réalisée à l'aide d'un repiquage des souches S1 et S2 cultivées sur une gélose nutritive pendant 24 heures.

-Quelques colonies ont ensuite été déposées sur des lames de verre contenant des gouttes d'eau distillée, puis étalées pour avoir une surface lisse et homogène.

-Après la préparation du frottis, les lames ont été passées à travers une flamme de bec Bunsen bleu (Figure 27) pour fixer le frottis par séchage (Cattoir, 2016).



Figure 27 : Etapes de préparation du frottis (Photo originale).

Etapes Coloration de Gram

-Après fixation et refroidissement du frottis, différentes techniques de coloration sont appliquées comme suit (Cattoir, 2016) :

-Coloration par le violet de gentiane par l'ajout de quelques gouttes de ce colorant au frottis préparé préalablement, laisser agir pendant 1 minute, puis rincer avec de l'eau distillée ;

-Mordançage au Lugol où la lame a été immergée dans le Lugol pour effectuer le mordançage, puis laissée agir pendant 1 minute. Ensuite, l'excès de Lugol a été éliminé et la lame a été rincée à l'eau distillée ;

-Décoloration par l'alcool par application de l'alcool sur le frottis, puis laisser agir pendant 15 secondes, puis rincer à l'eau distillée ;

-Recoloration par la Fuchsine par l'ajout de quelques gouttes de fuchsine sur le frottis, laisser agir pendant 1 minute, puis rincer la lame à l'eau distillée. Ensuite, sécher la lame en la chauffant à la flamme bleue du bec Bunsen (Figure 28).

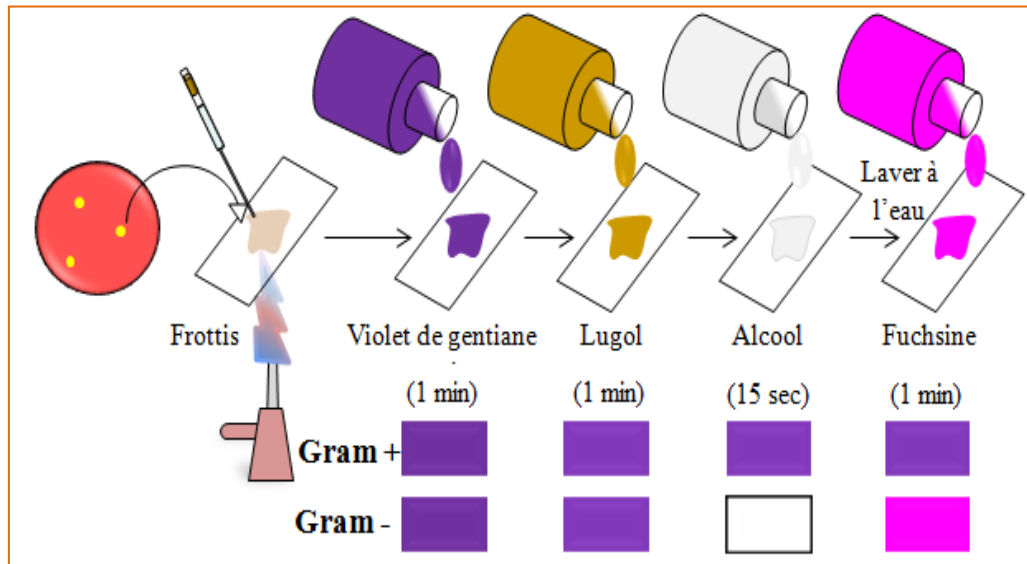


Figure 28: Procédure de coloration de Gram (Amiri et Boualleg, 2014)

Observation microscopique

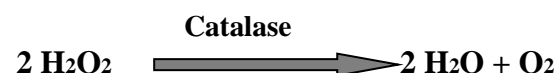
L'observation des frottis colorés a été faite à l'aide de microscope optique à l'objectif (X100) avec l'ajout de 1 à 2 gouttes de l'huile à immersion pour déterminer le type de Gram des souches étudiées (Cattoir, 2016).

III.2.3.3. Tests biochimiques

Les bactéries S1, S2 ont été soumises à une identification classique à l'aide d'une série de tests biochimiques qui sont comme suit :

a. Test catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène et en eau selon la réaction suivante :



À l'aide d'une pipette pasteur stérile nous avons prélevé des colonies bactériennes et nous les avons mises directement en contact avec une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) sur une lame propre et stérile, si la bactérie possède la catalase, on observera un dégagement de bulles

d'air (Figure 29), En revanche, si aucune bulle n'apparaît, cela indique que la bactérie ne possède pas cette enzyme (Cattoir, 2016).

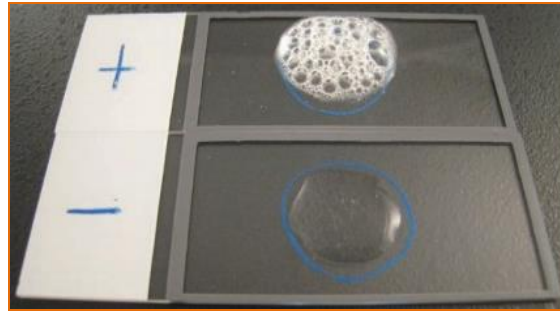


Figure 29: Test de catalase (Aryal, 2022).

b. Test Ortho-Nitro Phényl Galactopyranoside (ONPG)

Le test ONPG, également connu sous le nom de recherche de B-galactosidase, est une méthode qui permet de détecter la présence de l'enzyme capable de scinder la molécule de lactose, pour distinguer les bactéries lactose positif des bactéries lactose négatif (Sayad, 2008).

Une suspension dense de bactéries est préparée en mélangeant celles-ci avec 5 ml de l'eau distillée, puis ajouter avec une pince flambée et refroidie un disque imprégné d'ONPG, ensuite nous avons incubé pendant 30 minutes à une température de 37°C. Si le milieu dans lequel le test est effectué prend une couleur jaune, cela indique la présence d'ONPG. En revanche, si le milieu ne change pas de couleur et reste sans couleur, cela indique l'absence d'ONPG (Sayad, 2008).

c. Test ADH, LDC et ODC

Ce test est généralement utilisé pour identifier les espèces de la famille *Enterobacteriaceae*, qui facilite la recherche de la lysine décarboxylase (LDC), de l'ornithine décarboxylase (ODC) et de l'arginine dihydrolase (ADH) (Aryal, 2022).

Pour réaliser ce test, à partir d'une culture pure et fraîche sur une gélose nutritive. Chaque milieu (LDC, ODC, ADH) a été ensemencé avec une colonie bactérienne, puis incubé pendant 24 heures à 37°C. Si le milieu présente une coloration jaune, cela indique un virage acide ce qui est considéré comme un résultat négatif. En revanche, si le milieu garde la coloration violette, cela indique un virage alcalin ce qui est considéré comme un résultat positif (Aryal, 2022).

d. Test de citrate (CIT)

La gélose citrate de Simmons est un milieu de culture utilisé pour différencier les bactéries gram-négatives en fonction de leur capacité à utiliser le citrate comme seule source de carbone (MacWilliams, 2009).

À l'aide d'une boucle d'inoculation stérile, en prélever des colonies bactériennes et les transférer sur la surface de la gélose citrate, puis les étaler de manière uniforme sur la surface de la gélose en effectuant des stries. L'incubation a été réalisée à une température de 37°C pendant 18 à 48 heures (ou jusqu'à 7 jours si nécessaire). Après l'incubation, les bactéries citrate positives montrent une réaction positive caractérisée par une croissance avec une couleur bleu-vert dans le milieu incliné. En revanche, les bactéries citrate négatives ne montrent pas de croissance significative et le milieu reste vert (MacWilliams, 2009).

e. Production de sulfure d'hydrogène H₂S

Des colonies bactériennes de la souche S1 et S2 ont étéensemencées dans le culot par piqûre centrale et par des stries serrées sur la pente du milieu Kligler-Hajna, ensuite les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 h. Un précipité noir est considéré comme un résultat positif pour la production de sulfure d'hydrogène, en cas d'absence de formation de précipité et de noircissement du milieu (incolore), le résultat est négatif (Lebres, 2004).

f. Recherche de l'uréase

Des colonies bactériennes ont étéensemencées dans un bouillon d'urée indole. Par la suite, les tubes ont été délicatement agités pour suspendre les colonies, puis incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures avec les bouchons desserrés. Les bouillons ont été examinés à 8, 12, 24 et 48 heures d'incubation pour déterminer tout changement de couleur. Dans ce test, un résultat positif est caractérisé par l'apparition d'une couleur rose vif (fuchsia) dans le bouillon, tandis qu'un résultat négatif est indiqué par l'absence de changement de couleur (Tankeshwar, 2014).

g. Recherche de la tryptophane-désaminase

La présence de tryptophane désaminase (TDA) est mise en évidence par l'ajout de perchlorure de fer (réactif de TDA), qui en cas de réaction positive se traduit par une coloration brun rougeâtre du milieu (indole d'urée) et la couleur jaune-orangée indique un résultat négatif (Debabza, 2014).

h. Formation de l'indole

L'indole est formé par l'hydrolyse du tryptophane, ce qui génère une molécule d'indole, ce processus est mis en évidence dans le test réalisé dans un milieu de culture d'urée indole. L'indole produit par la bactérie est détecté à l'aide du réactif de Kovac, un résultat positif est caractérisé par la formation d'un anneau d'une couleur rouge ou rouge-violet dans la couche d'alcool à la surface du bouillon. En revanche, un résultat négatif se manifeste par une coloration jaune (Kannika, 2003).

i. Dégradation de la gélatine

Ce test a été réalisé en ajoutant un disque de Köhn constitué de gélatine, dans une suspension dense en eau stérile ou en eau peptonée. En cas de présence de l'enzyme gélatinase, diffusion de pigments noirs, le résultat est positif, en cas d'absence de l'enzyme aucune diffusion de pigments noirs, le résultat est négatif (De Vos et al., 2009).

j. Test de Voges-Proskauer (VP)

Le test de Voges-Proskauer a été réalisé sur le milieu d'urée-tryptophane, une suspension bactérienne a étéensemencée dans le milieu puis incubation pendant 24 heures à la température optimale. 10 gouttes d'alpha naphthol (VP1 et VP2) ont été ajoutées, l'observation a été faite après quelques minutes à une heure. L'apparition de la couleur rouge indique un résultat positif, tandis qu'un résultat négatif aucune changement de couleur (Marchal et Bourdon).

k. Réduction de nitrate en NO_3^- / NO_2^-

Les bouillons de nitrate ont étéensemencés avec une suspension bactérienne, les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures. Après l'incubation, 6 à 8 gouttes des réactifs nitrites 1 et 2 ont été ajoutées, puis observer la réaction par le développement de la couleur en une minute ou moins. Si aucune couleur ne s'est développée, une pincée de la poudre de zinc a été ajoutée pour la recherche de la présence de gaz N_2 . Il était important d'observer pendant au moins 3 minutes pour permettre le développement d'une couleur rouge (Aryal, 2022).

l. Assimilation des glucides

Ce test permet de déterminer si une bactérie est capable de métaboliser un glucide spécifique. Il est généralement réalisé en mesurant les changements de couleur dans le milieu

contenant le substrat à tester comme seule source de (Glucose, Mannitol, Inositol, Sorbitol, Rhamnose, Saccharose, Melibiose, Amygdaline, Arabinose) un résultat positif est généralement exprimé par un changement de couleur vers le jaune (Debabza, 2014).

III.2.4. Prétraitement des substrats

Dans cette étude, quatre substrats à savoir : pelures de banane, huile de friture, coquilles d'œufs, lactosérum ont été utilisés comme seule source de carbone et de l'énergie pour étudier l'effet de substrat sur la production des biosurfactants par les souches bactériennes (S1 et S2).

a. Les pelures de banane

-2 kg de banane mûre (*Musa Cavendish*) ont été utilisée. Afin d'éliminer la poussière, les pelures ont été nettoyées avec de l'eau minéral et essuyées avec du papier absorbant.

-Après épluchage, les pelures ont été coupées en petits morceaux, et ont été arrangées sur des plaques en métal, de sorte que le coté jaune sois en contact avec la plaque, la peau blanche tend vers l'extérieur.

-Les plaques contenant les pelures coupées sont déplacées dans un ventilateur, séché à 45° C, à une ventilation maximale.

-Durant le séchage, un échantillon des pelures, ont été pesé régulièrement matins et soirs à la même heure (10h et 14h).

-Lors de la stabilisation du poids (après 3 jours), le séchage est arrêté (Figure 43), et les pelures ont été récupérées (Iqbal et al, 2008).

-Avec un moulin à café, les épluchures ont été broyées, et ont été tamisées avec un tamiseur de 0.2 µm de diamètres, jusqu'à obtenir une poudre fine.

b. L'huile de friture

-L'huile de friture, collectée à la maison, a été filtré avec une passoire, afin d'éliminer les matières solides, inorganique, et autres contaminants.

c. Les coquilles d'œufs

-5 coquilles d'œufs, ont été bien nettoyées, par lavage à l'eau du robinet, et ont été séchées à l'air libre.

-Avec un moulin à café, ils ont été broyés puis tamisés avec un tamis de 0,2 μm de diamètre, jusqu'à obtenir une poudre fine (Figure 30).



Figure 30 : Préparation de la poudre des coquilles d'œufs (Photo originale).

d. Lactosérum

-1 litre lactosérum préparé à la maison, a été acidifié avec HCl (1N) à un $\text{pH}=4,5$, puis autoclavé pendant 90 min à $121,3^{\circ}\text{C}$ pour dénaturer les protéines.

-Le lactosérum stérilisé a été filtré avec une passoire afin d'éliminer les macromolécules.

-1 gramme de la poudre des coquilles d'œufs a été ajouté au lactosérum filtré, puis sur une plaque chauffante, il a été agité pendant 30 minutes à une température de 200°C .

-Après agitation, le pH de lactosérum a été ajusté à un pH de 7.2 ± 0.2 avec NaOH (1N), à l'aide du pH -mètre (Alkan et al., 2019).

-Une 2^{ème} filtration a été réalisée afin d'éliminer les débris restants (Figure 31).



Figure 31: Filtration et mesure de pH de lactosérum (Photo originale).

III.2.5. Préparation des milieux pour la production des biosurfactants

Trois erlenmeyers de 500 ml contenant 250 ml de milieu de base MSM (Annexe N°2). 5 g de la poudre de la banane, 5 g de glucose et 5 ml d'huile (concentration 2% de source de carbone) ont été ajoutés séparément pour préparer respectivement les milieux : MB, MG, MH. ML est le milieu à base de lactosérum enrichi par la poudre de coques des œufs (1%). Ensuite (Figure 32), après agitation, les milieux ont été filtrés et le pH des milieux a été ajusté à une valeur de $7,2\pm 0,2$ (Yalaoui-Guellal et al., 2018).

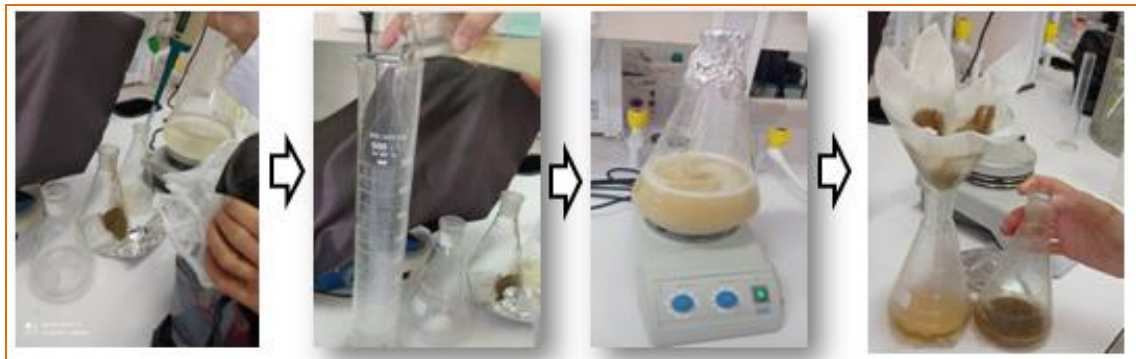


Figure 32 : Etapes de préparation des milieux MSM avec les différentes sources de carbone (Photo originale).

Les milieux MSM, préparés avec différentes sources de carbone, ainsi que le lactosérum enrichi avec des coquilles d'œufs, ont été soigneusement répartis à un volume de 50 ml dans des flacons de 200 ml, avant d'être autoclavés à une température de $121,3^{\circ}\text{C}$ pendant une durée de 21 minutes (Figure 47).

III.2.6. Suivi de la production des biosurfactants

La production des biosurfactants a été effectuée par le biais d'un processus de fermentation submergée de type Batch, en utilisant un milieu minimum minéral (MSM) dont le pH a été ajusté à $7,2\pm 0,2$ (Yalaoui-Guellal et al., 2018), supplémenté avec différents substrats (MB, MG, MH) et également le milieu ML (à base de lactosérum).

III.2.6.1. Préparation de la suspension bactérienne

Devant le bec Bunsen, en utilisant une pipette pasteur flambée, des colonies morphologiquement similaires ont été prélevées à partir des boîtes pétries contenant les souches S1 et S2. Ces colonies ont ensuite été déposées dans des tubes à essai contenant 9 ml

d'eau physiologique autoclavée, puis agitées vigoureusement à l'aide d'un vortex jusqu'à ce que le mélange soit uniforme.

L'absorbance de ces suspensions a été mesurée à une longueur d'onde de 620 nm où elle a été ajustée dans un intervalle (0,15-0,20), en basant sur la solution de MacFerland 0.5% (Yalaoui-Guellal et al., 2020).

III.2.6.2. Production des biosurfactants

La fermentation a été effectuée en inoculant 1 ml de la solution ajustée de chaque souche (S1 et S2) dans des flacons contenant différents milieux (MG, MH, ML, MB). Les expériences ont été menées en duplicata pour chaque souche et chaque milieu, afin d'obtenir des résultats statistiquement représentatifs. Les flacons ont été ensuite incubés à 30°C sous agitation à une vitesse de 150 tr/min pendant 7 jours (Yalaoui-Guellal et al., 2018 avec modification).

III.2.7. Détermination de la biomasse bactérienne totale

La population microbienne a été évaluée par la méthode de la biomasse bactérienne totale, en se basant sur le poids sec des cellules. À la fin de la période d'incubation, les échantillons ont été soumis à une centrifugation à 5000 rpm pendant 30 minutes à une température de 4°C (Figure 33), ce qui a permis d'obtenir deux phases : un surnageant contenant les biosurfactants et un culot représentant la biomasse bactérienne (Yalaoui-Guellal et al., 2020).



Figure 33: Réalisation de la centrifugation des surnageants (Photo originale).

Les culots, issus de l'étape de centrifugation, ont été recueillis dans des boîtes de Pétri en verre, dont le poids initial (P_0) était préalablement mesuré, en veillant à respecter les milieux et les souches bactériennes. Après avoir été soigneusement séchées durant 24 heures à

une température de 80°C, les boîtes ont subi une nouvelle pesée (Ps) (Figure 34), permettant ainsi de déterminer la biomasse bactérienne sèche (BBS) grâce la formule suivante :

$$BBS = \frac{PS - P_0}{VP}$$

Où BBS est la biomasse bactérienne exprimée en mg/ml, Ps est le poids des boîtes après séchage, P₀ est le poids des boîtes vides et Vp est le volume de prélèvement (Yalaoui-Guellal et al., 2020).

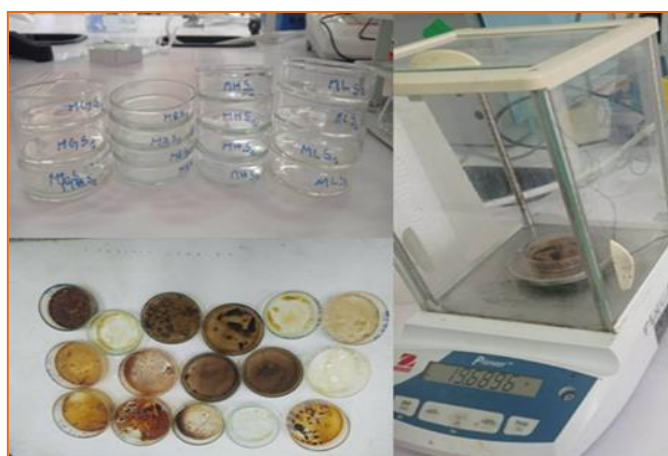


Figure 34 : Etapes de mesure de la biomasse sèche (Photo originale).

III.2.8. Dosage des sucres réducteurs

Cette technique repose sur la formation d'un chromatophore entre le réactif DNS et les extrémités réductrices des molécules de sucre. En fait, à haute température, dans un milieu de base, et en présence de sucres réducteurs, le réactif DNS jaune est réduit à brun 3 acide amino-5-nitrosalicylique, et les groupes de sucres aldéhyde sont oxydés en groupes carboxyles (Miller,1959).

Un volume de 0,5 ml de réactif de DNS a été ajouté à un volume identique de surnageant de chaque milieu testé, dans des tubes à essai. Après agitation, les tubes ont été incubés à une température de 100°C pendant 5 minutes dans un bain-marie. Après refroidissement à température ambiante, à l'abri de toute exposition lumineuse, pendant 10 minutes, 5 ml d'eau distillée ont été ajoutés dans chaque tube (Figure 35), en agitant vigoureusement. La teneur en sucre réducteur des échantillons a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à 540 nm (Yañez-Ocampo et al., 2017).

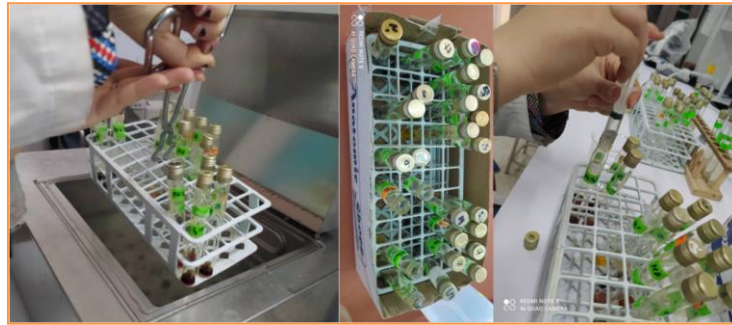


Figure 35 : Dosage des sucres réducteurs (Photo originale).

III.2.9. Tests de criblage de la production des biosurfactants

L'activité hémolytique, le test de déplacement de l'huile, l'activité d'émulsification, la tension superficielle ont été utilisés pour détecter la production de biosurfactants par les isolats bactériens (Satpute et al., 2010). En fonction du milieu de culture et de la souche inoculée, la quantité de biosurfactants produits a été estimée en recueillant les surnageants issue de la centrifugation, en réalisant des expériences à base de plusieurs tests avec répétition.

III.2.9.1. L'activité hémolytique

Les biosurfactants peuvent mener à la lyse des hématies. Ce principe est utilisé pour le test d'hémolyse qui a été développé par (Mulligan et al., 1984). Pour cela, des milieux solides tels que l'agar Luria (AL) et l'agar nutritif (AN) sont utilisés, complétés par 5% de sang frais total (Carrillo et al., 1996 ; Banat, 1993). Les disques imbibés de surnageant de chaque milieu de fermentation ont été déposés sur les géloses au sang (Figure 36), puis incubés à une température de 30°C pendant deux jours (Walter et al., 2010).



Figure 36 : Etapes de réalisation du test d'hémolyse (Photo originale).

Les BS positifs provoquent une lyse des cellules sanguines et présentent une coloration, anneau transparent autour des colonies (Walter et al., 2010). Comme la gélose sanguine est un milieu complexe, il est difficile d'examiner la production des biosurfactants d'une culture dans des conditions de culture variées directement sur l'agar (Youssef et al., 2004). Cependant, l'activité hémolytique n'était pas considérée comme un critère fiable pour détecter l'activité des biosurfactants (Satpute et al., 2008).

III.2.9.2. Test de dispersion du pétrole

Dans une boîte de Pétri en verre, 1000 μ l de pétrole brut ont été ajoutés à 50 ml d'eau distillée. Ensuite, 500 μ l de bouillon de culture ont été déposés sur la surface de l'eau recouverte d'huile (Figure 37). Si la colonie est entourée d'un halo émulsifié, cela indique une production positive de biosurfactants (Morikawa et al., 2000 avec modification).

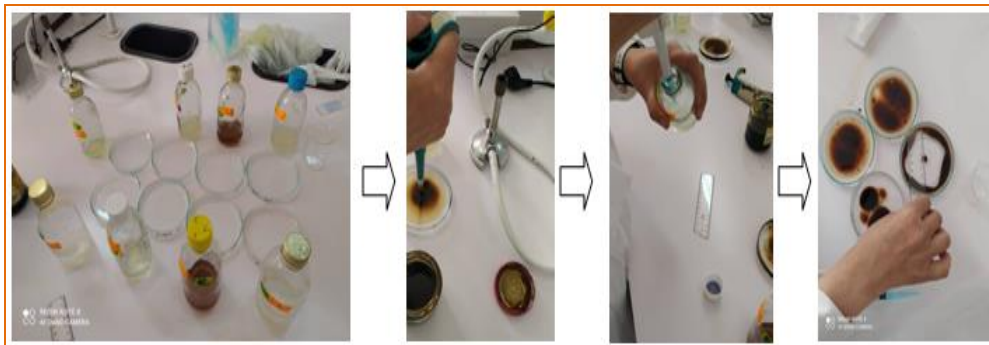


Figure 37: Test de déplacement d'huile (Photo originale).

Le déplacement de l'huile et la création d'une zone claire sont des indicateurs de la présence de biosurfactants dans le surnageant, ce qui fait de cette méthode un test de criblage qualitatif des souches productrices de biosurfactants (Mesbaiah, 2015; Morikawa et al., 2000).

III.2.9.3. Test d'émulsification (E24)

Dans cette méthode, la solution de biosurfactants ou le surnageant de la culture est mélangé à un substrat hydrophobe (Pétrole). L'apparition d'une couche émulsifiée indique la présence de biosurfactants (Walter et al., 2010). Dans un tube à essai, des volumes égaux de surnageant et d'huile sont combinés et mélangés au vortex à une vitesse maximale pendant cinq minutes (Figure 38).



Figure 38 : Quelques étapes de test d'émulsification (E24) (Photo originale).

Après avoir laissé les tubes reposer pendant 24 heures à température ambiante, l'indice d'émulsification E24 est déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$E24 = (He / Ht) * 100$$

Où E24 est l'indice d'émulsion après 24h, He est la hauteur de la couche d'émulsion, et Ht est la hauteur totale du liquide (Emtiazi et al., 2009). Les émulsions formées par les isolats ont été comparés à celles formées par une solution de 0,35 % (P/V) de tensioactif synthétique Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) dans de l'eau distillée (Yalaoui-Guellal et al., 2018).

III.2.9.4. Mesure de la tension superficielle

La méthode de criblage la plus simple et la plus appropriée pour le dépistage préliminaire des microbes producteurs de biosurfactants est la mesure directe de l'activité superficielle du surnageant de culture (Lin, 1996). Cela donne une bonne indication de la production de biosurfactants.

La tension interfaciale (Figure 39a) est définie comme la force nécessaire pour rompre la surface entre deux liquides immiscibles, tandis que la tension superficielle (Figure 39b) se produit à l'interface entre un liquide et un gaz, tel que l'air et mesure la force nécessaire pour étendre la surface du liquide. Les deux tensions résultent du déséquilibre des forces d'attraction dans un liquide et à la surface ou à l'interface du liquide (Neindre, 1993 ; Yadav, 2023).

La tension superficielle des surnageants recueillis après centrifugation a été déterminée à l'aide d'un tensiomètre numérique et indiquée en mN/m (Figure 40). Pour mesurer la tension superficielle, il faut environ 45 millilitres de surnageant de culture.

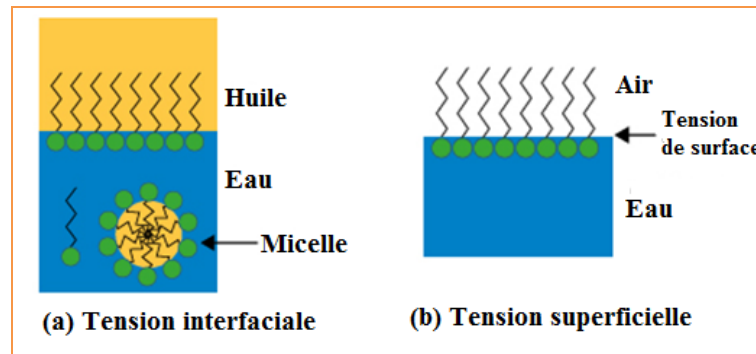


Figure 39: Schéma représentatif de la tension interfaciale et superficielle (Aspa, 2021).

Deux essais ont été réalisés pour chaque échantillon. Un microorganisme est considéré comme producteur de biosurfactants si la tension de surface de la culture est réduite au-dessous de 40 mN/m (Cooper et Goldenberg, 1987).



Figure 40: Mesure de la tension superficielle (Photo originale).

III.2.10. Extraction du biosurfactants

L'extraction des biosurfactants à partir des surnageants obtenus a été effectuée par la technique d'extraction par précipitation acide (Cazals, 2020).

Le surnageant a été acidifié en ajustant son pH à une valeur entre (2-2,5) par l'ajout d'acide chlorhydrique (HCl 6N), puis laisser à une température de 4°C pendant une nuit en favorisant ainsi la précipitation des biosurfactants. Par la suite, le précipité a été récupéré par centrifugation à une vitesse de 5000 rpm pendant 30 minutes. Une fois la centrifugation terminée les précipitations ont été soigneusement récupérés et transférés dans des boîtes de

Pétri en verre, dont la masse initiale (P_0) a été préalablement mesurée (Figure 41). Le produit a été ensuite congelé à une température de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ et puis lyophilisé (Cazals, 2020).

Après la lyophilisation, la formule ci-dessous a été utilisée pour déterminer le poids des biosurfactants brutes sec :

$$P_{BS} = \frac{P_1 - P_0}{V}$$

Où P_{BS} est le poids sec des biosurfactants exprimée en mg/ml, P_1 est le poids des boîtes après lyophilisation, P_0 est le poids des boîtes vides et V est le volume de surnageant (Yalaoui-Guellal et al., 2020).

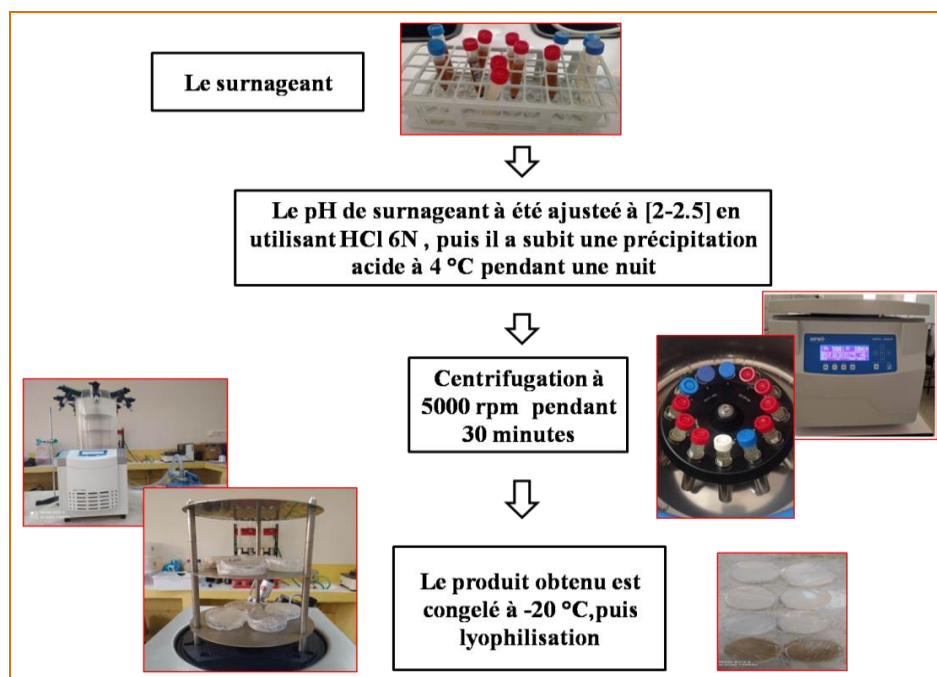


Figure 41: Schéma synthétique du protocole de l'extraction des biosurfactants (Photos originales).

Les biosurfactants obtenus sous forme de poudre sèche sont soigneusement déposés dans des tubes à Eppendorf préalablement étiquetés afin de les préserver de toute source d'humidité.

III.2.11. Analyse par spectroscopie IRTF-RTA des biosurfactants

L'analyse spectroscopique par Infrarouge à transformée de Fourier en mode réflectance total atténuée (IRTf-RTA) est basée sur l'adsorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Suite à la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques,

elle indique les fonctions chimiques présentes (Ouali, 2009). L'activité des biosurfactants dépend de leurs composants structuraux, des types de groupes hydrophiles et hydrophobes et de leur orientation spatiale (Bonmatin et al., 1994).

Le dispositif en question est conçu pour permettre une analyse directe de l'échantillon sans l'utilisation de KBr (sans pastilles) (figure 42). Une petite quantité de l'échantillon en poudre est déposée sur la surface diamant, puis pressée à l'aide d'un support. La mesure est effectuée à l'aide du logiciel *Spectra-Measurement*. Tout d'abord, il est nécessaire d'éliminer le blanc (CO_2 et la H_2O de l'appareil) avant de passer à l'analyse de l'échantillon (Gennet et Ley, 2004).



Figure 42 : Spectrophotomètre Infrarouge à Transformée de Fourier (FT/IR-4200) (Photo originale).

L'appareil est réglé de manière à obtenir une vibration de 50 Hertz pour une meilleure résolution des pics. Une fois le spectre obtenu, des corrections ATR (réflexion totale atténuée) sont effectuées pour améliorer la clarté des pics. En cas de présence de CO_2 et H_2O , l'option "réduction" est sélectionnée pour obtenir le spectre final dans une plage de 400 à 4000 cm^{-1} (Gennet et Ley, 2004).

Chapitre IV

IV. Résultats et discussion

IV.1. Revivification et vérification la pureté des souches

Les colonies caractéristiques des souches S1 et S2 peuvent être observées après qu'elles ont été revivifiées et incubées dans le milieu GN (Figure 43). La pureté de chaque souche est assurée par le fait que les colonies dans chaque boîte de Pétri ont les mêmes caractéristiques.

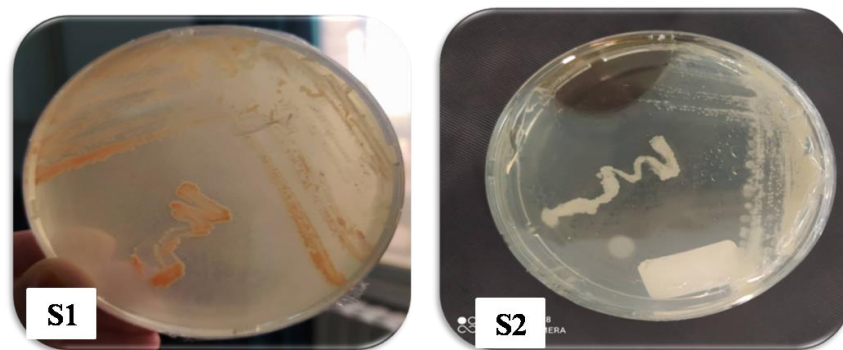


Figure 43: Résultats de la revivification et de la vérification de la pureté des souches (Photo originale).

IV.2. Etude microbiologique des souches S1 et S2

IV.2.1. Aspect macroscopique des souches S1 et S2

Les résultats de la caractérisation phénotypique primaire des souches étudiées ont été obtenus grâce à l'observation macroscopique des colonies isolées. Ces résultats sont détaillés dans le tableau ci-dessus.

Tableau 05 : Les caractères macroscopiques des souches S1 et S2

Caractère	Souche 1	Souche2
Taille	Microscopique	Microscopique
Élévation	Elevé	Elevé
Contour	Lisse	Lisse
Opacité	Translucides	Translucides
Consistance	Grasses crémeuses	Grasses crémeuses
Couleur	Rouge-orange	Beige
Odeur	Rien	Rien
Aspect de la pousse en milieu liquide	Trouble avec précipité à la fin	Trouble avec précipité à la fin

L'observation macroscopique des colonies des souches isolées S1 et S2 révèlent des caractéristiques communes telles qu'un aspect trouble avec un précipité à la fin, une taille microscopique, un contour lisse, une consistance crémeuse et une élévation élevée, sans présence d'odeur. Cependant, il y a aussi quelques différences entre les deux souches. La souche S1 présente une couleur rouge-orangée, alors que la souche S2 a une couleur beige.

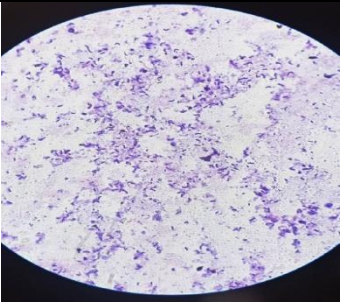
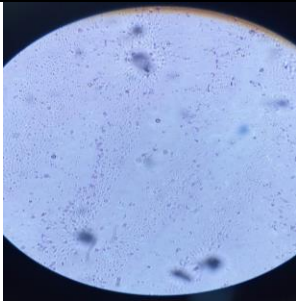
Il est important de noter que l'observation des caractères macroscopiques seule ne suffit pas à une identification précise d'une souche dans des conditions de culture standardisées. D'autres techniques, telles que l'observation microscopique, les tests biochimiques et moléculaires, sont souvent nécessaires pour confirmer l'identification. Cependant, les caractères macroscopiques fournissent une première indication qui guide les étapes ultérieures d'identification (Pushchino, 2016)

IV.2.2. Aspect microscopique et biochimique

IV.2.2.1. Coloration de Gram

Le tableau suivant montre les résultats de l'aspect microscopique des souches examinées après coloration Gram.

Tableau 06 : L'aspect microscopique des souches S1 et S2 après la coloration de Gram.

	Souche 1	Souche 2
		
Coloration de Gram	Violette	Violette
Aspect des colonies	Coques	Bâtonnet

D'après l'examen microscopique, il a été constaté que les souches 1 et 2 sont des bactéries à Gram positives, avec une morphologie en forme de coque pour la souche 1 et en forme de bâtonnet pour la souche 2. Le genre bactérien et l'espèce ne peuvent être déterminés à l'aide des critères susmentionnés. Des tests supplémentaires, tels que des analyses biochimiques et le séquençage de l'ADN de l'ARN ribosomal 16S, sont alors nécessaires pour une identification complète.

La coloration de gram permet une identification préliminaire des bactéries en tant que gram-positives ou gram-négatives, différenciant les bactéries en fonction de leurs caractéristiques chimiques et physiques. Les bactéries Gram-positives possèdent une couche de peptidoglycane plus épaisse dans leur paroi cellulaire (colorées en violet), En revanche, les bactéries Gram-négatives ont une couche de peptidoglycane plus fine (colorées en rose), et l'évaluation de caractéristiques bactériennes supplémentaires (leur regroupement, morphologie, taille) permet d'approfondir leur classification. Cette technique est largement utilisée en microbiologie pour son rôle clé dans l'identification bactérienne et l'analyse des échantillons microbiologiques (Kristensen, 2023).

IV.2.2.2. Caractéristiques biochimiques

Les résultats des tests biochimiques réalisés sur les souches 1 et 2 sont présenté dans le tableau 07.

Tableau 07: Quelques caractéristiques biochimiques des bactéries étudiées.

Caractère	Souche 1	Souche 2
Catalase	-	-
NPG	-	-
ADH	-	-
LDC	-	-
ODC	-	-
CIT	+	-
H ₂ S	-	-
URE	-	-
TDA	-	-
IND	-	-
VP	-	-
GEL	+	+
MAN	-	-
INO	-	-
SOR	-	-
RHA	-	-
SAC	-	-
MEL	-	-
MAY	-	-
ARA	-	-
NO ₂ - NO ₃ -	- +	- +

+ : Réponse positive, - : Réponse négative,

Après l'incubation, les tests ont été lus pour déterminer la positivité et la négativité des résultats. Les résultats ont montré que les deux souches ont des caractéristiques négatives similaires telles que l'ONPG, ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, TDA, IND, VP, MAN, INO, SOR, RHA, SAC, MEL, MAY, ARA. Cela suggère que les enzymes nécessaires pour dégrader ces substrats particuliers ne sont pas présentes dans les deux souches, qui confirme l'absence d'activité enzymatique spécifique dans ces voies métaboliques (Popović et al., 2022).

Cependant, il y a une différence entre les souches dans leur capacité à métaboliser le citrate. La souche 1 a montré une réaction positive, ce qui indique sa capacité à utiliser le citrate comme seule source de carbone. En revanche, la souche 2 a donné une réaction négative, ce qui signifie qu'elle ne peut pas métaboliser le citrate de cette manière. De plus, les deux souches ont montré des réactions positives pour les tests de réduction du nitrate (NO₂⁻) et de dégradation de la gélatine (GEL). Cela indique leur capacité à réduire le nitrate ainsi que leur capacité à produire des enzymes capables de dégrader la gélatine. Ce qui suggère la présence d'enzymes spécifiques leur permettant d'effectuer ces réactions métaboliques (Denis 2007).

Il est important de noter que ces observations macroscopiques et les résultats des tests fournissent des informations préliminaires sur les caractéristiques métaboliques des souches bactériennes. Cependant, une caractérisation plus approfondie, incluant d'autres tests et analyses complémentaires, serait nécessaire pour une identification précise et complète des souches bactériennes (Masson, 2016).

IV.3. Suivi de la production de biosurfactants

IV.3.1. L'activité hémolytique

Les souches S1 et S2 ont été soumises à un test d'activité hémolytique en les ensemençant sur une gélose contenant du sang frais. Le résultat de ce test est présenté dans la (Figure 44).

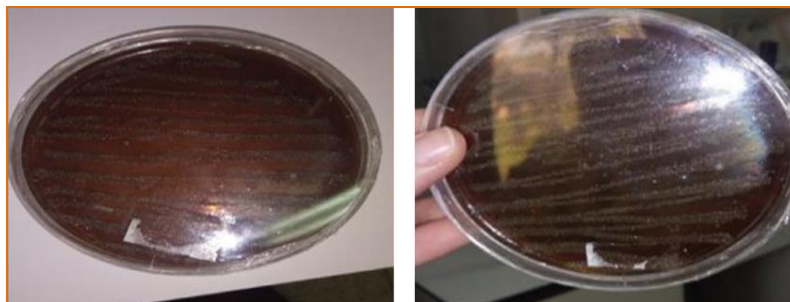


Figure 44: Résultats de test d'hémolyse sur les deux souches S1 et S2 (Photo originale).

En utilisant le test d'activité hémolytique du surnageant de culture, aucune activité hémolytique n'a été observée après une nuit d'incubation. Toutefois, il convient de souligner que l'absence d'hémolyse ne constitue pas une indication fiable de l'absence de biosurfactants, étant donné que cette méthode peut produire des résultats erronés en raison de la variabilité de l'activité hémolytique des biosurfactants (Walter et al., 2010). En effet, certaines études ont signalé que certains biosurfactants ne présentent pas d'activité hémolytique (Schulz et al., 1991).

Les résultats du test de l'activité hémolytique ont révélé que les souches S1 et S2 ne présentent pas d'activité hémolytique, ce qui indique que les biosurfactants produits par ces souches ne possèdent pas cette propriété. Cette caractéristique non hémolytique des souches S1 et S2 offre des perspectives prometteuses pour leur utilisation dans divers domaines, notamment la pharmacologie, la cosmétique et l'agroalimentaire (Inès et Dhouha, 2015).

L'étude menée par Das et ses collègues en 2008 a démontré les propriétés des lipopeptides non hémolytiques produits par une souche marine *Bacillus circulans*, qui présente une activité antimicrobienne, offrant ainsi un fort potentiel pour des applications biomédicales. Par conséquent, les auteurs ont préconisé l'utilisation sécurisée de ces biosurfactants en tant que candidats antimicrobiens potentiels pour les êtres humains et les animaux (Symmank et al., 2002).

IV.3.2. Détermination de la croissance bactérienne

Cette expérience a pour but de comparer le rendement de la biomasse des souches bactériennes S1 et S2 en présence de diverses sources de carbone. L'histogramme ci-dessus illustre les résultats relatifs à la biomasse bactérienne obtenue pour chacune des deux souches productrices, en fonction de leur milieu respectif.

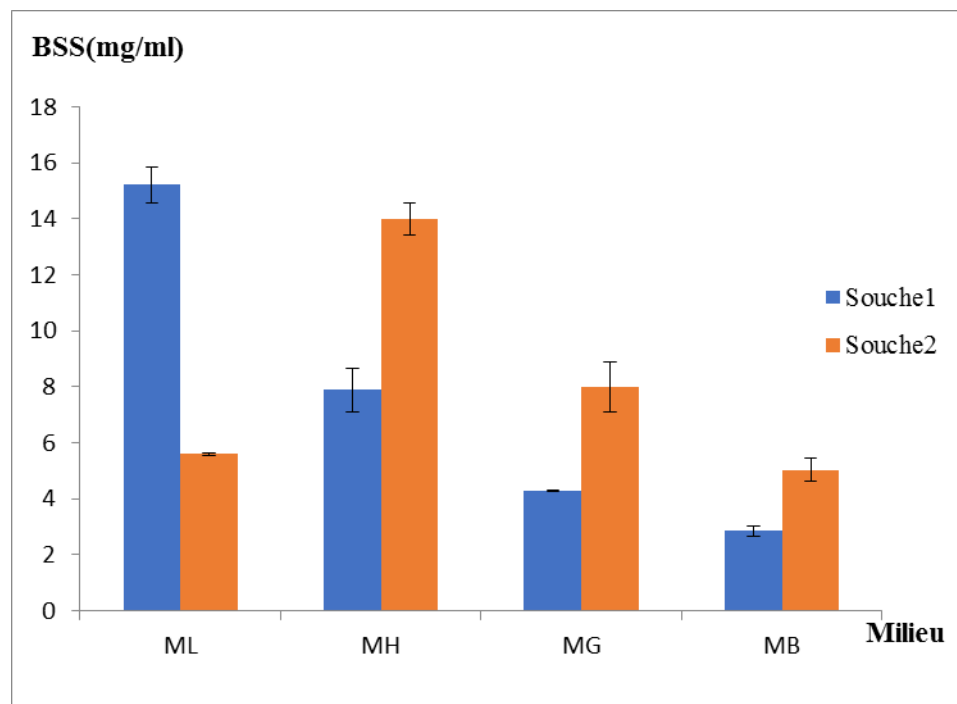


Figure 45 : Biomasse bactérienne sèche des deux souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisés. *ML : Milieu de lactosérum, MH : Milieu de l’huile, MG : Milieu de glucose, MB : Milieu des épiluchures de banane.*

La source de carbone choisi est faite sur la capacité de dégradation de substrat par les bactéries pour le but de la production des biosurfactants. D’après les résultats de la biomasse bactérienne sèche obtenue après 7 jours incubation sur les différents milieux synthétiques (MG, MH, ML) et un milieu de référence (MG) de deux souches productrices des biosurfactants S1 et S2, il a été constaté que dans le milieu de référence (MG) où le glucose a été la seule source de carbone, la souche 2 a donné une biomasse bactérienne sèche plus élevée que celle de la souche 1, les valeurs de BBS ont été $4,27 \pm 0,02$ mg/ml et $7,98 \pm 0,89$ mg/ml, respectivement.

La même observation a été constaté pour le milieu MH où le l’huile est la seule source de carbone, la biomasse bactérienne sèche des souches S1 et S2 a été de $7,89 \pm 0,784$ mg/ml et $13,98 \pm 0,575$ mg/ml respectivement. Ces déchets induisent la production de biosurfactants en raison de leur composition structurale en acides gras (Das et Kumar, 2018 ; Varjani et Upasani, 2016).

Par contre pour le milieu ML où le lactosérum a été la seule source de carbone et enrichi avec les écorces d’œufs comme source des minéraux, la biomasse bactérienne sèche a été très

élevée pour la souche S1 par rapport à la souche S2. La BBS a donné pour les souches S1 et S2 des valeurs de $15,21 \pm 0,636$ mg/ml et $5,58 \pm 0,052$ mg/ml respectivement.

Le lactosérum peut être utilisé comme substrat pour la production de biosurfactants, en raison de ses grandes concentrations de matière sèche, de lactose et de protéines (Gomaa, 2013 ; Makkar et al., 2011). Par ailleurs, il a été souligné dans des travaux précédents que le lactosérum est un excellent milieu de croissance pour différents types de micro-organismes, en tant qu'alternative aux milieux de culture commerciaux (Panesar et Kennedy, 2012).

Dans le milieu MB où les épluchures de bananes ont été la seule source de carbone, la biomasse bactérienne sèche des souches S1 et S2 ont été $2,85 \pm 0,174$ mg/ml et $5,03 \pm 0,417$ mg/ml, respectivement.

Des études ont révélé que la peau de banane présentait une teneur importante en cendres 8,50% et en matière organique de 91,50 % constituée de protéines, de lipides et de glucides (Anhwange et al, 2009). En outre, la peau de banane présentait des quantités substantielles d'azote et de phosphore, qui sont des éléments indispensables à la croissance des micro-organismes, étant donné que le phosphore est un constituant essentiel de l'acide nucléique, des nucléotides, des phospholipides et des lipopolysaccharides (Nagarajaiah et Prakash, 2011 ; Zheng et Wang, 2013).

Les résultats de la biomasse bactérienne sèche obtenus pour les quatre milieux utilisés ont révélé que la souche 1 a obtenu le poids sec le plus élevé avec une croissance de $15,21 \pm 0,636$ mg/ml dans le milieu ML, tandis que la souche 2 a obtenu le poids sec le plus élevé avec une croissance de $13,98 \pm 0,575$ mg/ml dans le milieu MH.

En revanche, la souche 1 a obtenu un donné taux de la biomasse sèche le plus faible avec un taux de $2,85 \pm 0,174$ mg/ml dans le milieu MB, tandis que la souche 2 a obtenu le poids sec le plus faible avec une biomasse de $5,03 \pm 0,417$ mg/ml dans le même milieu MB.

La souche 2 a manifesté une croissance bactérienne importante dans les milieux MH, MG et MB, alors qu'elle a affiché une croissance modérée dans le milieu ML, en comparaison avec la souche 1 et vice versa.

IV.3.3. Suivi de l'activité d'émulsification (E24)

L'activité d'émulsification des souches S1 et S2 a été mesurée après 24 heures selon la méthode de Cooper et Goldenberg (1987), indiquant des valeurs oscillantes entre 47% et 53%. Les résultats ont été présentés sur la figure ci-dessus.

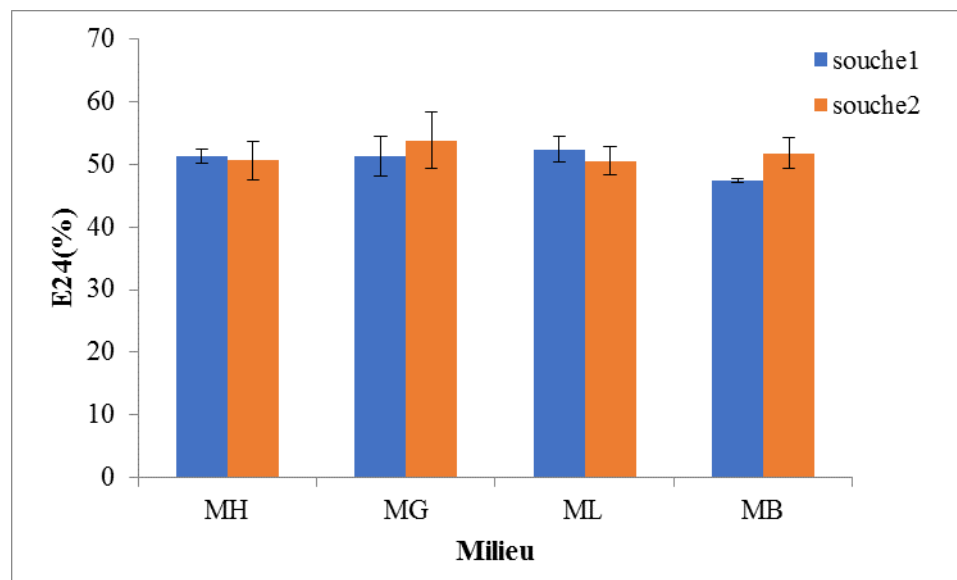


Figure 46: Evaluation d'indice d'émulsification pour les souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisé. *ML* : Milieu de lactosérum, *MH* : Milieu de l'huile de friture, *MG* : Milieu de glucose, *MB* : Milieu des épluchures de banane.

D'après ces résultats obtenus de test d'émulsification, il a été constaté que les meilleurs résultats ont été obtenus dans le milieu MG avec une valeur $53,87 \pm 4,479\%$ pour la souche S2, et dans le milieu ML avec une valeur de $52,44 \pm 2,042\%$ pour la souche S1. Le plus faible indice d'émulsification a été observé pour la souche 1 dans le milieu MB avec valeur de $47,46 \pm 0,309\%$, et avec une valeur de $50,59 \pm 2,279\%$ dans le milieu ML pour la souche 2.

Il est à noter que les souches bactériennes étudiées ont présenté des résultats similaires en ce qui concerne l'indice d'émulsification, avec des valeurs proches de 50% pour les quatre milieux analysés (à l'exception de la souche 1 dans le milieu MB). Cette observation suggère que les biosurfactants produits dans les milieux MH, ML et MB ont la capacité d'émulsification des solutions biphasiques (hydrophobe-hydrophile) en comparant à celle du milieu de référence MG.

Les souches bactériennes S1 et S2 ont la capacité d'émulsification, cette propriété est cruciale pour la biodégradation du pétrole brut dans l'eau, car elle améliore la biodisponibilité

de l'huile et augmente ainsi le taux de biodégradation. Par conséquent, ces bactéries ont le potentiel de jouer un rôle essentiel dans la décontamination des sites pollués par des substances hydrophobe tels que les hydrocarbures (Quek et al., 2006 ; Bredholt et al., 1998 ; Mnif et al., 2011).

V.3.4. Test de déplacement d'huile (DDH)

Les résultats du test de déplacement d'huile appliqué aux surnageants des souches S1 et S2, obtenus suite à leur culture sur les quatre milieux utilisés, ont été présentés dans l'histogramme qui suit.

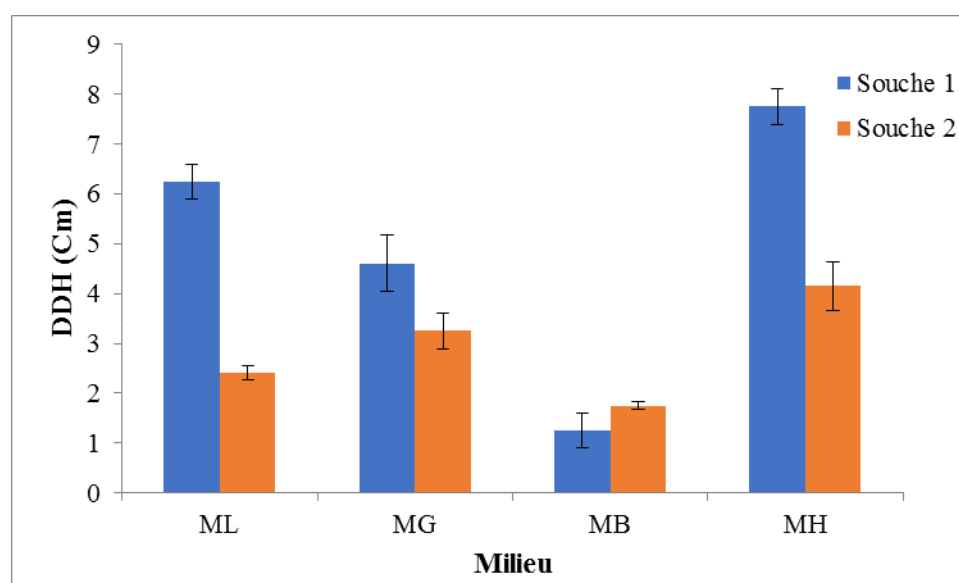


Figure 47: Résultats de déplacement d'huile des biosurfactants pour les souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisé. *ML* : Milieu de lactosérum, *MH* : Milieu de l'huile de friture, *MG* : Milieu de glucose, *MB* : Milieu des épluchures de banane.

Le test de déplacement d'huile permet de mesurer le diamètre de la zone claire formée par l'activité de surface de la solution de surfactants testée, par rapport à l'huile. Un diamètre important du déplacement d'huile témoigne une activité de surface élevée des biosurfactants (Yalaoui-Guellal et al., 2021).

Les souches bactériennes S1 et S2 ont montré une activité de surface élevée avec des diamètres de zone allant de $1,25 \pm 0,353$ cm à $7,75 \pm 0,353$ cm, comme illustrée dans la figure 66. Les résultats obtenus ont ainsi mis en évidence que les souches S1 et S2 ont produit des biosurfactants. Effectivement, Il est couramment rapporté dans la littérature scientifique, que des microorganismes sont capables de produire des tensioactifs lorsqu'ils se développent sur

des hydrocarbures comme le pétrole brut ou d'autres composés hydrophobes (Iqbal et al., 1995 ; Kumar et al., 2006).

Le diamètre des zones claires obtenues à l'aide de la méthode d'épandage d'huile était plus grand pour les cultures de la souche S1 dans les milieux MH, ML et MG avec des valeurs qui ont été de $7,75 \pm 0,353$ cm, $6,25 \pm 2,4$ cm $4,6 \pm 0,565$ cm respectivement, en comparant avec la souche 2 avec des valeurs qui ont été de $4,15 \pm 0,494$ cm, $2,4 \pm 0,141$ cm, $3,25 \pm 0,353$ cm, respectivement. A l'exception du milieu MB qui a donné des valeurs de la zone claire les plus faibles, où la souche 2 a produit une zone claire avec une valeur de $1,75 \pm 0,07$ cm et la souche 1 a donné une valeur de $1,25 \pm 0,353$ cm.

Les résultats obtenus ont permis de constater que l'huile de friture a été la source de carbone la plus favorable à la production de biosurfactants pour les souches 1 et 2. Les diamètres de déplacement de pétrole associés à ces souches ont été de $7,75 \pm 0,353$ cm et $4,15 \pm 0,494$ cm respectivement.

IV.3.5. Test des sucres réducteurs par la DNS

La méthode de DNS est un test quantitatif qui met en évidence la présence de sucres réducteurs dans un échantillon, les résultats d'une concentration moyenne initiale et finale des souches 1 et 2 sont présentés dans les histogrammes ci-dessous.

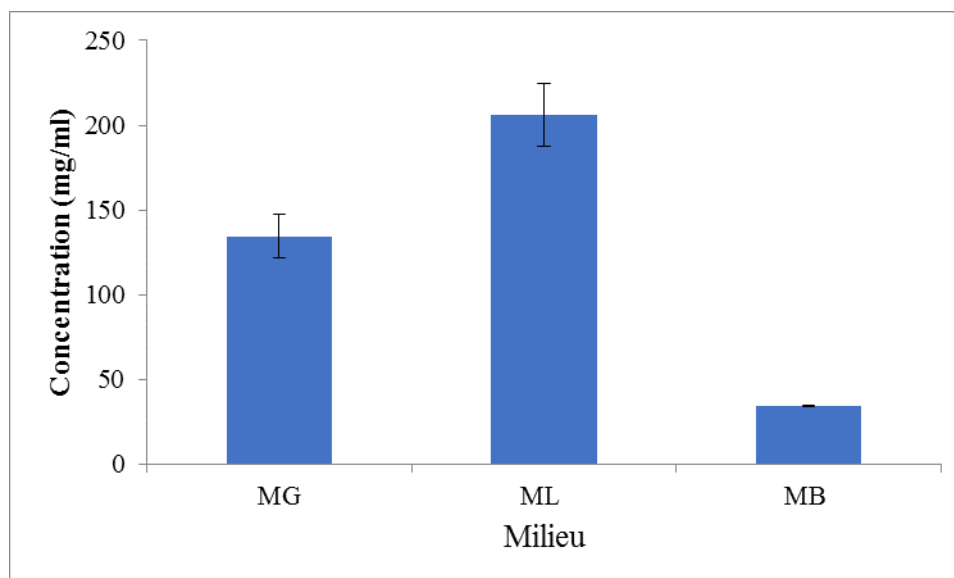


Figure 48: Résultats de dosage des sucres réducteurs à T_0 pour les deux souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisé. *ML* : Milieu de lactosérum, *MH* : Milieu de l'huile de friture, *MG* : Milieu de glucose, *MB* : Milieu des épluchures de banane

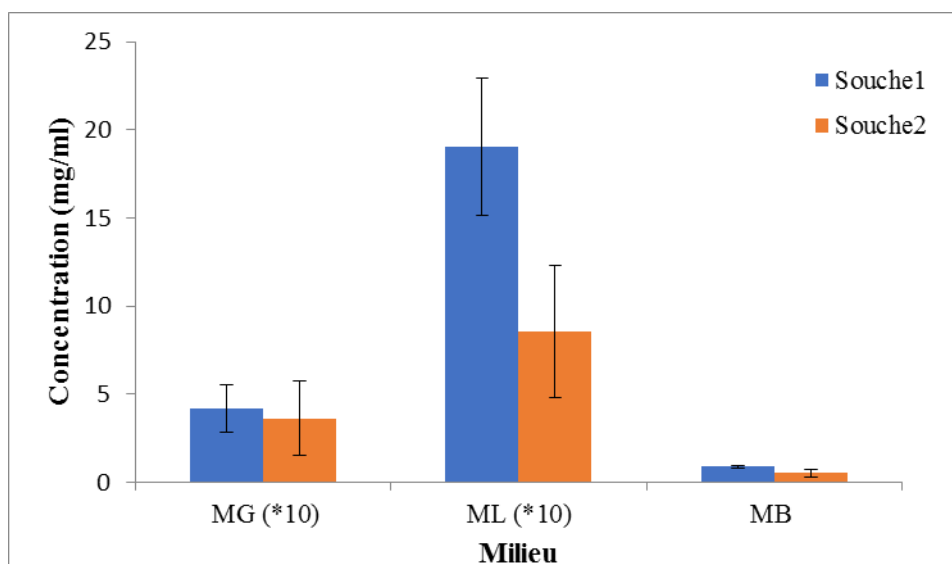


Figure 49: Résultats de dosage des sucres réducteurs à T=final pour les deux souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisé. *ML* : Milieu de lactosérum, *MH* : Milieu de l'huile de friture, *MG* : Milieu de glucose, *MB* : Milieu des épluchures de banane.

L'analyse comparative des concentrations des sucres aux instants T_f et T_0 a permis de constater qu'une diminution de la concentration des sucres dans les trois milieux testés (MG, ML et MB) pour les deux souches S1 et S2. Ces dernières ont présenté, au début de la fermentation ($T=0$) les concentrations les plus élevées de sucre réducteur total dans le milieu de culture ML, à savoir $190,30 \pm 3,884$ mg/ml et $85,4 \pm 3,781$ mg/ml, respectivement.

En revanche, pour les milieux MG et MB, les souches ont affiché des concentrations relativement faibles de sucre au temps final de la fermentation ($T=Final$), où des concentrations ont été enregistré pour le milieu MG avec des valeurs de $42,05 \pm 1,437$ mg/ml et $36,28 \pm 2,146$ mg/ml pour les souches S1 et S2, respectivement. Les valeurs les plus faibles ont été observées dans le milieu MB, avec des concentrations de $0,89 \pm 0,066$ mg/ml et $0,51 \pm 0,201$ mg/ml pour les souches S1 et S2, respectivement.

Les données obtenues suggèrent que les souches bactériennes S1 et S2 ont été capables d'utiliser les différentes sources de sucres disponibles dans les trois milieux de culture utilisés pour leur croissance et leur métabolisme, y compris la production de biosurfactants qui ont été sécrétés dans le moût de la fermentation. Cependant on peut suggérer que les biosurfactants produits ne sont pas de nature glucidique.

Les recherches d'Emagaet et al. (2007) ont établi que la teneur en sucres réducteurs dans la peau de bananes *Moussa Cavendish* pouvait varier de 22,00 à 32,40 mg/g. Il est apparu que

les résultats de cette étude étaient différents de ceux précédemment obtenus en raison de variables comme la géographie des plantations de bananes, et les modes de stockage (Akkarachaneeyakorn et al, 2018).

La spécificité la plus remarquable du lactosérum est sa forte teneur en lactose (40-57 %), ce sucre étant une principale source de carbone pour les microorganismes (Veolia Water STI, 2012). Cette situation crée donc un environnement optimal pour leur croissance. C'est pourquoi on remarque une teneur élevée en sucres réducteurs dans les milieux à base de lactosérum.

IV.3.6. Mesure de la tension superficielle

Les résultats de la mesure de la tension superficielle des souches S1 et S2, sont donnés dans l'histogramme ci-dessus.

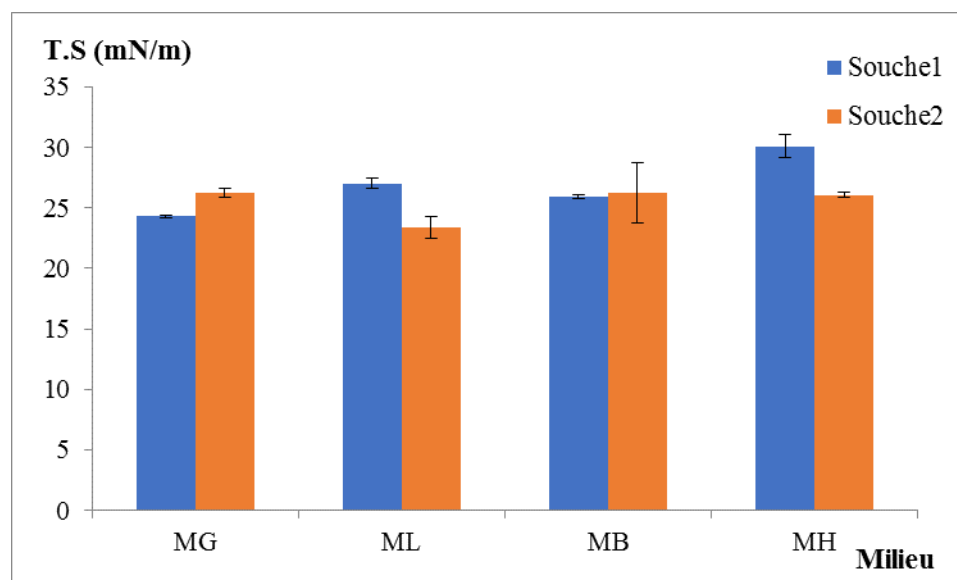


Figure 50 : Evaluation de la tension superficielle pour les deux souches S1 et S2 par rapports aux différents milieux utilisé. *ML : Milieu de lactosérum, MH : Milieu de l'huile de friture, MG : Milieu de glucose, MB : Milieu des épluchures de banane.*

Sur la base des résultats antérieurs, il a été noté que l'efficacité d'un surfactant est déterminée par sa capacité à réduire la tension superficielle d'une émulsion (Sluiter et al., 2008). Dans cette étude, la tension superficielle est comparé à celle de l'eau qui précédemment mesuré (T.S= 47,29 mN/m).

Les résultats de cette mesure ont montré que tous les échantillons ont donné des valeurs de la tension superficielle inférieure à celle de l'eau (< 47 mN/m) qui confirme la capacité des

souches S1 et S2 à produire des biosurfactants dans les différents milieux de culture MB, MG, MH, ainsi que dans le milieu de référence MG. De plus, cela indique la capacité de ces tensioactifs à réduire la force d'interface du mélange entre deux composants non miscibles, permettant ainsi leur émulsion (Magalhães et al., 2018).

La détermination de la tension superficielle a montré que la souche S2 était capable de réduire la TS dans le milieu ML avec une valeur maximal $23,37 \pm 0,905$ mN/m. De manière similaire, la souche S1 était capable de réduire la tension superficielle dans le milieu MG, avec une valeur de $24,29 \pm 0,12$ mN/m. Les biosurfactants peuvent apporter une contribution significative à la réduction des tensions superficielles à des valeurs comprises entre 20 et 30 mN/m (Haba et al., 2003).

IV.3.7. Détermination de poids sec des biosurfactants

Le tableau montre le rendement des biosurfactants bruts produits par les souches S1 et S2 obtenus après extraction par précipitation par HCl et après lyophilisation.

Tableau 08 : Rendement des biosurfactants après extraction par précipitation en mg/ml.

	MH	ML	MG	MB
Souche 1	2.76	5.94	1.37	1.18
Souche 2	2.98	5.85	1.44	1.27

Dans le cadre de l'étude menée, il a été constaté que la souche 1 et la souche 2 ont donné un meilleur rendement de biosurfactants dans le milieu ML, avec un taux de 5,94 mg/ml et de 5,85 mg/ml, respectivement. En revanche, le rendement le plus faible a été enregistré pour le milieu MB pour la souche 1 et la souche 2 avec des taux de 1,18 mg/ml et de 1,27 mg/ml respectivement.

Selon les résultats, le lactosérum enrichi avec la poudre des coquilles d'œufs est la meilleure source de carbone pour la production de biosurfactants par la souche S1 et la souche S2. Ces résultats mettent en évidence les différences de performances entre les deux souches étudiées, ainsi que leur capacité à produire des tensioactifs dans des milieux variés.

Le lactosérum contient tous les types de nutriments nécessaires à la croissance de divers types de micro-organismes (lactose, les protéines solubles, les vitamines liposolubles et

hydrosolubles, les matières grasses et les éléments minéraux), ainsi que des bactéries responsables de la production de surfactants (Ali et Rajak, 2013 ; Calbrix, 2023).

Il est aussi enrichi avec la poudre des coquilles d'œufs qui est elle-même riche en calcium, magnésium et phosphore (Duchemin, 2019). Ce qui explique la production élevée des biosurfactants par les deux souches bactériennes S1 et S2 dans ce dernier en comparant aux autres milieux à base de l'huile, des épluchures de bananes, et de glucose.

IV.3.8. Analyse par spectroscopie IFTF-ATR

L'identification des groupes fonctionnels présents dans les biosurfactants produits par les souches S1 et S2 dans les quatre milieux MG, MB, MH et ML a été réalisée par le biais d'une analyse FTIR. Le tableau ci-dessus présente quelques bandes caractéristiques et leurs spectres d'adsorption.

Tableau 09 : Plages de fréquences vibratoires caractéristiques de certains groupes fonctionnels organiques courants (Collet, 2016 ; Gaffney et al., 2002).

Classes fonctionnelles	Nombres d'ondes (Cm^{-1})	Attribution
Alcools et phénols	3250-3700	-OH
Aromatiques amines, amides/ primaires	3320-3520	-NH ₂
Alcanes	2800-3000	CH ₃ , CH ₂ et CH ; 2 ou 3 bandes
Alcanes	1350-1470	CH ₂ et CH ₃
Alcanes	1370-1390	CH ₃
Alcènes	1900-2000	C=C
Alcools et phénols	3580-3650	O-H (libre)
Alcools et phénols	3200-3550	O-H (avec liaison H)
Alcools et phénols	970-1250	C-O
Alcools et phénols	1330-1430	O-H déformation dans le plan
Amines	3400-3500	N-H (1°-amines), 2 bandes
Aldéhydes et cétones	2690-2840	C-H (aldéhyde C-H)
Aldéhydes et cétones	1720-1740	C=O (aldéhyde)

		saturé)
Aldéhydes et cétones	1710-1720	C=O (Cétone saturé)

Tableau 09 (Suite): Plages de fréquences vibratoires caractéristiques de certains groupes fonctionnels organiques courants (Collet, 2016 ; Gaffney et al., 2002)

Classes fonctionnelles	Nombres d'ondes (Cm ⁻¹)	Attribution
Amides primaires	1650-1670	-C=O
Acide carboxylique et dérivés	2500-3300	O-H (bande très large)
Acide carboxylique et dérivés	1785-1815	C=O
Acide carboxylique et dérivés	1750 et 1820 (anhydres)	C=O (2-bandes)
Acide carboxylique et dérivés	1040-1100	O-C
Acide carboxylique et dérivés	1735-1750 (esters)	C=O
Acide carboxylique et dérivés	1630-1695 (amides)	C=O (amide I bande)
Vinyle	900-950	-CH=CH ₂

Les spectres FTIR ont été acquis dans la plage de 400 à 4000 cm⁻¹, ont été obtenus et ont présenté dans les Figure 51,52.

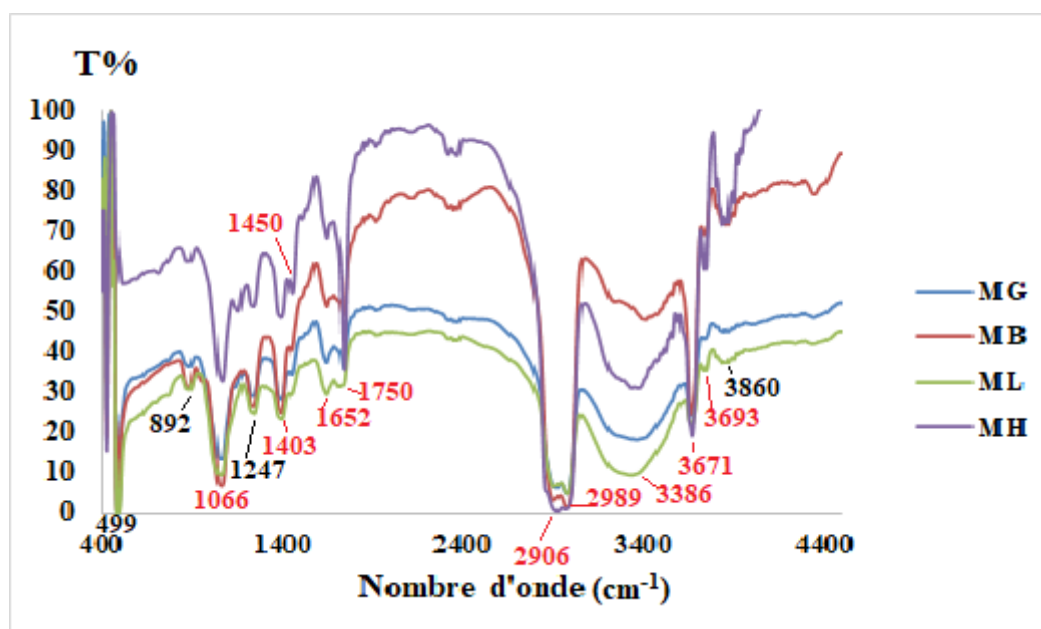


Figure 51: Spectres d'infrarouge de la souche S1 dans les différents milieux utilisés.

ML : Milieu de lactosérum, MH : Milieu de l'huile de friture, MG : Milieu de glucose, MB : Milieu des épiluchures de banane.

Le spectre d'absorption infrarouge des biosurfactants produits par la souche 1, (Figure 51), met en évidence la présence de groupes fonctionnels variés. La présence d'un groupe O-C d'acide carboxylique et ces dérivés est révélé par le pic à 1066 cm^{-1} . La bande d'absorption observée à 1652 cm^{-1} (liaison amide) et à 1750 cm^{-1} (2-bandes) indique la présence d'un groupe carbonyle (C=O) d'acide carboxylique et ces dérivés (Collet, 2016).

La présence de groupements CH_2 et CH_3 et CH dans les alcanes, des composants communs à tous les biosurfactants, est mise en évidence par des pic à $1450, 2906$ et 2989 cm^{-1} (Collet, 2016 ; Aboseoud et al., 2008). Les pic 1403 cm^{-1} , 3693 cm^{-1} , 3671 cm^{-1} et 3386 cm^{-1} a révélé la présence d'un groupe OH d'alcools et phénols (Collet, 2016 ; Gaffney et al., 2002).

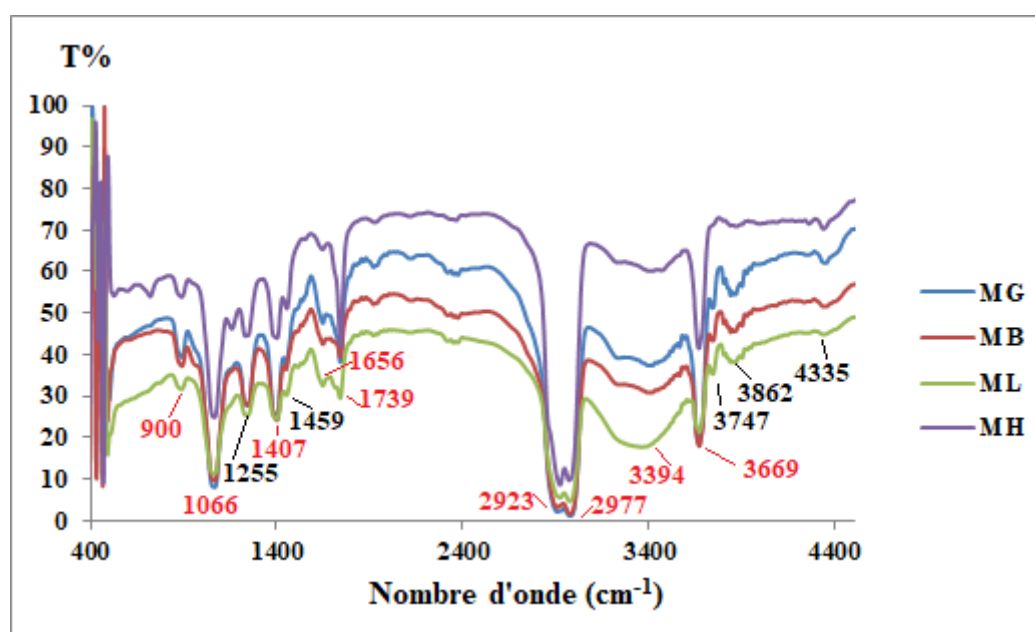


Figure 52: Spectres d'infrarouge de la souche S2 dans les différents milieux utilisé.

ML : Milieu de lactosérum, MH : Milieu de l'huile de friture, MG : Milieu de glucose, MB : Milieu des épiluchures de banane.

Les résultats de l'analyse spectrale des biosurfactants produits par la souche 2, (Figure 52), ont indiqué la présence de certaines fonctionnalités moléculaires. Une bande de fréquence à 900 cm^{-1} témoigne de la présence d'un groupement vinyle ($-\text{CH}=\text{CH}_2$) (Gaffney et al., 2002). De même, un pic à 1066 cm^{-1} révèle la présence d'un groupe O-C d'acide carboxylique et de ses dérivés (Collet, 2016).

Des bandes supplémentaires à 1407 cm^{-1} et 3669 cm^{-1} confirment la présence d'un groupe OH d'alcools et de phénols, tandis que des vibrations à 1656 cm^{-1} et 1739 cm^{-1} indiquent la présence d'un groupe carbonyle (C=O) d'acide carboxylique et de ses dérivés.

Enfin, des fréquences à 2923 et 2977 cm^{-1} témoignent respectivement de la présence de groupes CH_2 , CH_3 et CH dans les alcanes et une bande à 3394 cm^{-1} a suggéré la présence d'une liaison NH_2 de groupement amines ou amides (Collet, 2016 ; Gaffney et al., 2002).

Les spectres d'absorption infrarouge (Figure 51 et 52) ont mis en évidence la présence de groupes fonctionnels variés et ils ont illustré la présence à la fois des chaînes aliphatiques et peptidiques (Yalaoui-Guellal et al., 2021). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Banat (1995) et Rosenberg (2002), qui ont mis en évidence la présence quasi-systématique d'un groupement carboxylique ou ester dans la structure des biosurfactants.

D'après les figures 53 et 54, ont présenté une même allure de tous les spectres, où il a été enregistré des même pics mais avec une différence dans l'intensité de ces pics - qu'ils soient larges ou étroits – qui a indiqué une variation quantitative plutôt que qualitative. Cette similitude de configuration suggère l'existence de structure chimique identique pour chacun des quatre spectres, alors même que les différences détectées dans l'intensité des pics reflètent une variation quantitative qui leur est propre.

Les analyses FTIR des souches bactériennes S1 et S2 cultivées dans les 4 milieux ont démontré la présence simultanée d'une chaîne aliphatique et de groupes peptidiques dans les biosurfactants produits. Ces résultats suggèrent la présence de biosurfactants lipopeptidique tels que la surfactine et fengycine (Liu et al., 2016 ; Pereira et al., 2013).

Conclusion

De nombreux problèmes environnementaux de grande envergure affectent notre monde actuel, parmi lequel figure en bonne place la problématique majeure de la gestion des déchets issus de l'agro-industrie. L'objectif de cette étude a été de produire des biosurfactants ayant des propriétés de tension active intéressantes tout en réduisant les coûts de production. Pour y parvenir, différents sous-produits agricoles et déchets industriels peu conventionnels tel que les pelures de banane, le lactosérum, l'huile de friture, les couilles d'œufs ont été examinés ainsi que le glucose a été utilisé comme milieu de référence, en vue de la production des biosurfactants par deux souches bactériennes S1 et S2.

Les résultats obtenus ont révélé que les biosurfactants provenant des milieux contenant du glucose et du lactosérum enrichi avec des coquilles d'œufs ont présenté des indices d'émulsification considérables équivalant à 53,87% et 52,44% respectivement par rapport aux milieux consistant en l'huile et les pelures de bananes.

En outre, les biosurfactants issus des milieux d'huile de friture et de lactosérum enrichi avec des coquilles d'œufs ont présenté de grands diamètres d'halo de 7,75 cm et 6,25 cm respectivement, en comparaison avec les milieux à base de pelures de banane et de glucose. Le lactosérum enrichi avec des coquilles d'œufs et le glucose ont permis d'obtenir une réduction maximale de la tension superficielle à des valeurs de 23,37 mN/m et 24,29 mN/m respectivement.

Enfin, le milieu à base de lactosérum enrichi avec des coquilles d'œufs a présenté un rendement de biosurfactants élevé avec des valeurs de 5,94 g et 5,85 g pour la souche 1 et la souche 2 respectivement.

Ce travail a été effectué dans un temps limité, par conséquent, des perspectives ont été dégagées à fin d'approfondir et d'accomplir cette étude tels que :

- Identification moléculaire des souches par le séquençage de l'ADN complet, pour déterminer le genre et l'espèce des souches étudiées.
- Analyses chimiques par des méthodes avancées tels que HPLC-MS/MS, MLDI-TOF/MS.....etc., des biosurfactants produits par les souches testées pour déterminer leurs structures chimiques.
- Mettre en œuvre des applications de ces biosurfactants dans le domaine médicale, agroalimentaire, environnemental.

- Réalisation des tests des activités biologique *in vivo* à savoir l'activité antimicrobienne, anti-inflammatoire, anti-cancéreuse...etc.
- Caractérisation moléculaire gène codant la production de biosurfactants et d'étudier les différents mécanismes impliqués dans cette production pour amélioration la productivité des souches.
- Détermination des facteurs affectant la production des biosurfactants par les souches étudiées en utilisant le logiciel d'optimisation.
- Extrapolation de la production optimisée des biosurfactant à l'échelle industrielle dans des fermenteurs de grand volume.

Références bibliographiques

A

- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S., & Nabi, A. (2008). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, 223(1-3), 143-151.
- Abouseoud, M., Yataghene, A., Amrane, A., & Maachi, R. (2008). Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(11), 1303-1308.
- Adesra, A., Srivastava, V. K., & Varjani, S. (2021). Valorization of dairy wastes: integrative approaches for value added products. *Indian Journal of Microbiology*, 61(3), 270-278.
- Ahamed, M. I., & Prasad, R. (2021). *Microbial biosurfactants: preparation, properties and applications*: Springer Nature
- Ahuja, K., & Singh, S. (2020). Biosurfactants market size by product. *Glob. Market Insights*, 564.
- Akkarachaneeyakorn, S., Suwakrai, A., & Pewngam, D. (2018). Optimization of reducing sugar production from enzymatic hydrolysis of banana peels using response surface methodology. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 40(1).
- Ali, S. R., & Rajak, B. R. C. P. M. S. (2013). Screening and characterization of biosurfactants producing microorganism from natural environment (whey spilled soil). *Screening*, 3(13).
- Alkan, Z., Erginkaya, Z., Konuray, G., & Turhan, E. Ü. (2019). Production of biosurfactant by lactic acid bacteria using whey as growth medium. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 43(5), 676-683.
- Ambaye, T. G., Vaccari, M., Prasad, S., & Rtimi, S. (2021). Preparation, characterization and application of biosurfactant in various industries: A critical review on progress, challenges and perspectives. *Environmental Technology & Innovation*, 24, 102090.
- Amiri, F., & Boualleg, W. (2014). Etude Bactériologique de l'eau de la retenue collinaire "Hadjar Gafta" de la Commune Nechmaya (wilaya de Guelma). Mémoire de Master. Université 8 Mai 1945 Guelma. 78p.
- Anburajan, L., Meena, B., Raghavan, R. V., Shridhar, D., Joseph, T. C., Vinithkumar, N.V., ... Kirubakaran, R. (2015). Heterologous expression, purification, and phylogenetic analysis of oil-degrading biosurfactant biosynthesis genes from the marine sponge-associated *Bacillus licheniformis* NIOT-06. *Bioprocess and biosystems engineering*, 38, 1009-1018.

- Anhwange, B., Ugye, T., & Nyiaatagher, T. (2009). Chemical composition of *Musa sapientum* (banana) peels. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 8(6), 437-442.
- Aryal S. (2022). Nitrate Reduction Test- Objectives, Principle, Procedure, Results. Asselineau.C et Asselineau.J. (1978). Trehalose containing glycolipids, *Prog. Chem. Ftas Lipids*, 16, 59-99.
- Aslam, R., Mobin, M., Aslam, J., & Zehra, S. (2023). *Advancements in Biosurfactants Research: Springer Nature*
- Asmer, H.-J., Lang, S., Wagner, F., & Wray, V. (1988). Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 1460-1466.
- Aspa. (2021). Tensioactifs ou agent de surface - Syndicat ASPA INGRECOS. Consulté le 10 juillet 2023, à l'adresse <https://aspa-ingrecos.com/les-filieres-ingredients-les-tensioactifs/>

B

- Bages-Estopa, S., White, D., Winterburn, J., Webb, C., & Martin, P. (2018). Production and separation of a trehalolipid biosurfactant. *Biochemical Engineering Journal*, 139, 85-94.
- Banat, I. M. (1993). The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* sp. *Biotechnology letters*, 15, 591-594.
- Banat, I. M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource technology*, 51(1), 1-12.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 495-508.
- Bhaumik, M., Dhanarajan, G., Chopra, J., Kumar, R., Hazra, C., & Sen, R. (2020). Production, partial purification and characterization of a proteoglycan bioemulsifier from an oleaginous yeast. *Bioprocess and biosystems engineering*, 43, 1747-1759.
- Bodour, A. A., Drees, K. P., & Maier, R. M. (2003). Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3280-3287.
- Bonmatin, J. M., Genest, M., Labbé, H., & Ptak, M. (1994). Solution three-dimensional structure of surfactin: A cyclic lipopeptide studied by 1H-nmr, distance geometry, and molecular dynamics. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 34(7), 975-986.

- Borsanyiova, M., Patil, A., Mukherji, R., Prabhune, A., & Bopegamage, S. (2016). Biological activity of sophorolipids and their possible use as antiviral agents. *Folia microbiologica*, 61, 85-89.
- Bredholt, H., Josefsen, K., Vatland, A., Bruheim, P., & Eimhjellen, K. (1998). Emulsification of crude oil by an alkane-oxidizing *Rhodococcus* species isolated from seawater. *Canadian journal of microbiology*, 44(4), 330-340.
- Burghoff, B. (2012). Foam fractionation applications. *Journal of Biotechnology*, 161(2), 126-137.

C

- Cai, Q., Zhang, B., Chen, B., Cao, T., & Lv, Z. (2016). Biosurfactant produced by a *Rhodococcus erythropolis* mutant as an oil spill response agent. *Water Quality Research Journal of Canada*, 51(2), 97-105.
- Calbrix, M. (2023). Qu'est-ce que le lactosérum déminéralisé ? Consulté le 24 juin 2023, à l'adresse <https://blog.armor-proteines.com/quest-ce-que-le-lactos%C3%A9rum-d%C3%A9min%C3%A9ralis%C3%A9>
- Calvo, C., Manzanera, M., Silva-Castro, G., Uad, I., & González-López, J. (2009). Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. *Future prospects. Science of the total environment*, 407(12), 3634-3640.
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 520-529.
- Carbonnelle D., Kouyoumdjian S., Audurier A., (1988). *Bactériologie médicale techniques usuelles*. Méd. Mal. Inf. France. 251 p.
- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1611(1-2), 91-97.
- Carrillo, P., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S., & Giulietti, A. (1996). Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 82-84.
- Cattoir, V., Denis, F., Martin, C., Ploy, M.-C., & Poyart, C. (2016). *Bactériologie médicale: techniques usuelles*: Elsevier Health Sciences.
- Cazals, F. (2020). Combinaison du lavage par biosurfactant et de la biodégradation dynamisée, pour la dépollution des eaux souterraines de sites contaminés par des HAP. Université Paris-Est

- Chambial, S., Dwivedi, S., Shukla, K. K., John, P. J., & Sharma, P. (2013). Vitamin C in disease prevention and cure: an overview. *Indian journal of clinical biochemistry*, 28, 314-328.
- Chandrasekharan, D. K. (2020). Batch, Fed Batch and Continuous Fermentation. Consulté le 24 mai 2023, à l'adresse <https://dhanusmicronotes.blogspot.com/2020/06/batch-fed-batch-and-continuous.html>
- Cheel, J., Urajová, P., Hájek, J., Hrouzek, P., Kuzma, M., Bouju, E., . . . Kopecký, J. (2017). Separation of cyclic lipopeptide puwainaphycins from cyanobacteria by countercurrent chromatography combined with polymeric resins and HPLC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 917-930.
- Chen, J., Wu, Q., Hua, Y., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2017). Potential applications of biosurfactant rhamnolipids in agriculture and biomedicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 8309-8319.
- Cherif, N. (2016). Production des biosurfactants par les microorganismes et leurs applications. Thèse de doctorat. Université Djillali Liabès de Sidi Bel Abbès. Algerie.107 p.
- Christofi, N., & Ivshina, I. (2002). Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. *Journal of Applied Microbiology*, 93(6), 915-929.
- Chtioui, O., Dimitrov, K., Gancel, F., Dhulster, P., & Nikov, I. (2012). Rotating discs bioreactor, a new tool for lipopeptides production. *Process Biochemistry*, 47(12), 2020-2024.
- Cochrane, S. A., & Vederas, J. C. (2016). Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal research reviews*, 36(1), 4-31.
- Collet, T. (2016). La spectroscopie infrarouge. *Photoniques* (82), 39-42.
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53(2), 224-229.
- Costa, J. A., Treichel, H., Santos, L. O., & Martins, V. G. (2018). Solid-state fermentation for the production of biosurfactants and their applications Current developments in biotechnology and bioengineering, Elsevier, 357-372.
- Coutte, F., Lecouturier, D., Ait Yahia, S., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., & Dhulster, P. (2010). Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 499-507.
- Coutte, F., Lecouturier, D., Firdaous, L., Kapel, R., Bazinet, L., Cabassud, C., & Dhulster, P. (2017). Recent trends in membrane bioreactors Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Elsevier, 279-311.

Cunningham, B. (2015). Simulating an Ideal Stirred Tank Reactor System. Consulté le 16 mai 2023, à l'adresse <https://www.comsol.fr/blogs/simulating-an-ideal-stirred-tank-reactor-system/>

D

Da Silva, R. R., da Silva, Y. A., e Silva, T. A. d. L., Sarubbo, L. A., & de Luna, J. M. (2022). Recent advances in environmental biotechnology: role of biosurfactants in remediation of heavy metals. *Research, Society and Development*, 11(5), e4411527453-e4411527453.

Dalmaso, G. Z. L., Ferreira, D., & Vermelho, A. B. (2015). Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine Drugs*, 13(4), 1925-1965.

Daniel, H.-J., Otto, R., Binder, M., Reuss, M., & Syldatk, C. (1999). Production of sophorolipids from whey: development of a two-stage process with *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509 and *Candida bombicola* ATCC 22214 using deproteinized whey concentrates as substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 40-45.

Das, A. J., & Kumar, R. (2018). Utilization of agro-industrial waste for biosurfactant production under submerged fermentation and its application in oil recovery from sand matrix. *Bioresource technology*, 260,279-311.

Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1675-1684.

Datta, P., Tiwari, P., & Pandey, L. M. (2018). Isolation and characterization of biosurfactant producing and oil degrading *Bacillus subtilis* MG495086 from formation water of Assam oil reservoir and its suitability for enhanced oil recovery. *Bioresource technology*, 270, 439-448.

De Andrade, C. J., De Andrade, L. M., Rocco, S. A., Sforça, M. L., Pastore, G. M., & Jauregi, P. (2017). A novel approach for the production and purification of mannosylerythritol lipids (MEL) by *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater as substrate. *Separation and Purification Technology*, 180, 157-167.

De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K. H. et Whitman. W. B, 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacterology*, 2nd edition. Volume III, The firmicutes. Springer, New York, USA.

Debabza M. (2014). Présentée en vue de L'obtention du diplôme de Doctorat En Microbiologie. Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire

- Delbeke, E. I., Everaert, J., Uitterhaegen, E., Verweire, S., Verlee, A., Talou, T., . . . Stevens, C. V. (2016). Petroselinic acid purification and its use for the fermentation of new sphorolipids. *AMB Express*, 6, 1-9.
- Delhoum, D. (2016). Caractérisation préliminaire de biosurfactant (s) secrété (s) par *Pseudomonas* sp. et évaluation de deux effets: antibactérien et stimulateur de croissance. Mémoire de Master. Université Mouloud Mammeri. Algerie.94 p.
- Derguine-Mecheri, L. (2019). Production et caractérisation des biosurfactants par des levures et des moisissures. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou. Algerie.167 p.
- Dolman, B. M., Kaisermann, C., Martin, P. J., & Winterburn, J. B. (2017). Integrated sphorolipid production and gravity separation. *Process Biochemistry*, 54, 162-171.
- Dolman, B. M., Wang, F., & Winterburn, J. B. (2019). Integrated production and separation of biosurfactants. *Process Biochemistry*, 83, 1-8.
- Domínguez Rivera, Á., Martínez Urbina, M. Á., & López y López, V. E. (2019). Advances on research in the use of agro-industrial waste in biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 155.
- Duchemin, F. A. É. P. R. (2019). Découvrez les supers pouvoirs de la coquille d'œuf. *Europe 1*. Consulté le 24 juin 2023, à l'adresse <https://www.europe1.fr>

E

- Edosa, T. T., Jo, Y. H., Keshavarz, M., & Han, Y. S. (2018). Biosurfactants: production and potential application in insect pest management. *Trends Entomol*, 14(79), 79-87.
- Emaga, T. H., Andrianaivo, R. H., Wathélet, B., Tchango, J. T., & Paquot, M. (2007). Effects of the stage of maturation and varieties on the chemical composition of banana and plantain peels. *Food chemistry*, 103(2), 279-311.
- Emtiazi, G., Saleh, T., & Hassanshahian, M. (2009). The effect of bacterial glutathione S-transferase on morpholine degradation. *Biotechnology journal*, 4(2), 202-205.

F

- Falode, O., Oluwadero, T., Nwadike, B., & Fagade, O. (2016). Performance of biosurfactant produced from pineapple waste for improving oil recovery. *Am Chem Sci J*, 15, 1-14.
- Fazli, R. R., & Hertadi, R. (2019). Production and characterization of rhamnolipids from bioconversion of palm oil mill effluent by the halophilic bacterium *Pseudomonas stutzeri* BK-AB12. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 38(3), e13007.

Fonseca, R., Silva, A., De França, F., Cardoso, V., & Sérvulo, E. (2007). Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain. Paper presented at the Applied Biochemistry and Biotechnology: The Twenty-Eighth Symposium Proceedings of the Twenty-Eight Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held April 30–May 3, 2006, in Nashville, Tennessee.

G

Gaffney, J. S., Marley, N. A., & Jones, D. E. (2002). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. Characterization of materials, 1-33.

Gaur, V. K., Regar, R. K., Dhiman, N., Gautam, K., Srivastava, J. K., Patnaik, S., . . . Manickam, N. (2019). Biosynthesis and characterization of sophorolipid biosurfactant by *Candida* spp.: application as food emulsifier and antibacterial agent. *Bioresource technology*, 285, 121314.

Gaur, V. K., Sharma, P., Sirohi, R., Varjani, S., Taherzadeh, M. J., Chang, J.-S., . . . Kim, S.-H. (2022). Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: An overview. *Bioresource technology*, 343, 126059.

Geetha, S., Banat, I. M., & Joshi, S. J. (2018). Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 23-32.

Gennet, D., & Ley, C. (2004). Introduction à la spectroscopie Infrarouge (I.R.). Consulté le 10 juin 2023, à l'adresse <https://culturesciences.chimie.ens.fr/thematiques/chimie-analytique/spectroscopies/introduction-a-la-spectroscopie-infrarouge-ir>

Geudens, N., Nasir, M. N., Crowet, J.-M., Raaijmakers, J. M., Fehér, K., Coenye, T., . . . Deleu, M. (2017). Membrane interactions of natural cyclic lipodepsipeptides of the viscosin group. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859(3), 331-339.

Gomaa, E. Z. (2013). Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56, 259-268.

Gurkok, S. (2021). Important parameters necessary in the bioreactor for the mass production of biosurfactants Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science (pp. 347-365): Elsevier.

H

Haque, E., & Hassan, S. (2020). Physicochemical Characterization and Anti-colon Cancer Activity of Biosurfactant Produced from Marine *Pseudomonas* sp. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 10(2).

Hrůzová, K., Patel, A., Masák, J., Mařátková, O., Rova, U., Christakopoulos, P., & Matsakas, L. (2020). A novel approach for the production of green biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* using renewable forest biomass. *Science of the total environment*, 711, 135099.

I

Igbonekwu, C. J., Osonwa, U. E., Umeyor, C. E., Ikegbunam, M. N., Uronnachi, E. M., & Esimone, C. O. (2014). Biosurfactant produced by novel halo-thermophilic bacterial strain from unconventional substrates. *Int J Pharmacogn*, 1(1), 73-81.

Inès, M., & Dhouha, G. (2015). Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. *Peptides*, 71, 100-112.

Iqbal, S., Haleem, S., Akhtar, M., Zia-ul-Haq, M., & Akbar, J. (2008). Efficiency of pomegranate peel extracts in stabilization of sunflower oil under accelerated conditions. *Food Research International*, 41(2), 194-200.

Iqbal, S., Khalid, Z., & Malik, K. (1995). Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*, 21(3), 176-179.

J

Jadhav, J., Dutta, S., Kale, S., & Pratap, A. (2018). Fermentative production of rhamnolipid and purification by adsorption chromatography. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(3), 234-241.

Janek, T., Mirończuk, A. M., Rymowicz, W., & Dobrowolski, A. (2020). High-yield expression of extracellular lipase from *Yarrowia lipolytica* and its interactions with lipopeptide biosurfactants: a biophysical approach. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 689, 108475.

Jiang, J., Zu, Y., Li, X., Meng, Q., & Long, X. (2020). Recent progress towards industrial rhamnolipids fermentation: process optimization and foam control. *Bioresource technology*, 298, 122394.

Jiménez-Peñalver, P., Koh, A., Gross, R., Gea, T., & Font, X. (2020). Biosurfactants from waste: structures and interfacial properties of sophorolipids produced from a residual oil cake. *Journal of Surfactants and Detergents*, 23(2), 481-486.

Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019a). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 184, 109607.

Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019b). Heterologous expression of S fp-type phosphopantetheinyl transferase is indispensable in the biosynthesis of lipopeptide biosurfactant. *Molecular Biotechnology*, 61, 836-851.

- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2020). Biotechnological applications of *Paenibacillus* sp. D9 lipopeptide biosurfactant produced in low-cost substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191, 921-941.
- Jimoh, A. A., Senbadejo, T. Y., Adeleke, R., & Lin, J. (2021). Development and genetic engineering of hyper-producing microbial strains for improved synthesis of biosurfactants. *Molecular Biotechnology*, 63, 267-288.
- Joffin, J. N., & Leyral, G. (2006). *Microbiologie technique [Technical microbiology]*. TI-Dictionnaire des techniques. 4eme édition. Bordeaux: CRDP d'aquitaine, 368.
- Johnson J.L., Phelps S.L., Cummins C.S., London J., Gasser F. (1980). Taxonomie of *Lactobacillus acidophilus* group, international journal of systematic Bacteriology, 30 :53-68.
- Jung, J., Yu, K. O., Ramzi, A. B., Choe, S. H., Kim, S. W., & Han, S. O. (2012). Improvement of surfactin production in *Bacillus subtilis* using synthetic wastewater by overexpression of specific extracellular signaling peptides, comX and phrC. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(9), 2349-2356.

K

- Kannika C. (2003). Diversity of halophilic bacteria in saline soil nongboreservoir, Maharakham at Province, Thailand. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy in Environmental Biology Suranaree : University of Technology. 20-56.
- Kashif, A., Rehman, R., Fuwad, A., Shahid, M. K., Dayarathne, H., Jamal, A., . . . Choi, Y. (2022). Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants–A critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 102718.
- Kee, S. H., Chiongson, J. B. V., Saludes, J. P., Vigneswari, S., Ramakrishna, S., & Bhubalan, K. (2021). Bioconversion of agro-industry sourced biowaste into biomaterials via microbial factories–A viable domain of circular economy. *Environmental Pollution*, 271, 116311.
- Khopade, A., Biao, R., Liu, X., Mahadik, K., Zhang, L., & Kokare, C. (2012). Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis* sp. B4. *Desalination*, 285, 198-204.
- Konishi, M., & Makino, M. (2018). Selective production of deacetylated mannosylerythritol lipid, MEL-D, by acetyltransferase disruption mutant of *Pseudozyma hubeiensis*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 125(1), 105-110.

- Konishi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Uemura, S., Iwabuchi, H., & Kitamoto, D. (2018). Efficient production of acid-form sophorolipids from waste glycerol and fatty acid methyl esters by *Candida floricola*. *Journal of Oleo Science*, 67(4), 489-496.
- Konwar, B. K. (2022). *Bacterial Biosurfactants: Isolation, Purification, Characterization, and Industrial Applications*: CRC Press
- Kosaric, N., & Sukan, F. V. (2014). *Biosurfactants: production and utilization—processes, technologies, and economics (Vol. 159)*: CRC press
- Kumar, M., Leon, V., Materano, A. D. S., Ilzins, O. A., Galindo-Castro, I., & Fuenmayor, S. L. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by biosurfactant-producing *Pseudomonas sp. IRI*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 61(3-4), 203-212.
- Kuyukina, M. S., & Ivshina, I. B. (2019). Production of trehalolipid biosurfactants by *Rhodococcus*. *Biology of Rhodococcus*, 271-298.

L

- Lang, S., & Wullbrandt, D. (1999). Rhamnose lipids—biosynthesis, microbial production and application potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 22-32.
- LE NEINDRE. (1993). Définitions. Consulté le 27 mai 2023, à l'adresse <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/sciences-fondamentales-th8/constantes-mecaniques-et-viscosite-42339210/tensions-superficielles-et-interfaciales-k475/definitions-k475niv10001.html#:~:text=La%20tension%20interfaciale%20est%20la,phases%20en%20pr%C3%A9sence%20sont%20modifi%C3%A9es>.
- Lebres E., (2004). *Identification biochimique des micro-organismes*, Institut Pasteur d'Algerie.
- Lin, S. C. (1996). Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 66(2), 109-120.
- Liu, B., Liu, J., Ju, M., Li, X., & Yu, Q. (2016). Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine pollution bulletin*, 107(1), 46-51.
- Liu, D., Chen, Y., Ding, F.-Y., Zhao, T., Wu, J.-L., Guo, T., . . . Cao, Z. (2014). Biobutanol production in a *Clostridium acetobutylicum* biofilm reactor integrated with simultaneous product recovery by adsorption. *Biotechnology for biofuels*, 7, 1-13.
- Lourenço, L. A., Alberton Magina, M. D., Tavares, L. B. B., Guelli Ulson de Souza, S. M. A., García Román, M., & Altmajer Vaz, D. (2018). Biosurfactant production by

Trametes versicolor grown on two-phase olive mill waste in solid-state fermentation. Environmental technology, 39(23), 3066-3076.

Luo, K., Ye, Q., Yi, X., Yang, Q., Li, X.-m., Chen, H.-b., . . . Zeng, G.-m. (2013). Hydrolysis and acidification of waste-activated sludge in the presence of biosurfactant rhamnolipid: effect of pH. Applied Microbiology and Biotechnology, 97, 5597-5604.

M

MacWilliams, M. P. (2009). Citrate test protocol. American Society for Microbiology.

Madihalli, C., Sudhakar, H., & Doble, M. (2020). Production and investigation of the physico-chemical properties of MEL-A from glycerol and coconut water. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 36, 1-11.

Magalhães, E. R. B., Silva, F. L., Sousa, M. A. D. S. B., & Dos Santos, E. S. (2018). Use of different agroindustrial waste and produced water for biosurfactant production. Biosciences Biotechnology Research Asia, 15(1), 17-26.

Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB Express, 1, 1-19.

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

Manga, E. B., Celik, P. A., Cabuk, A., & Banat, I. M. (2021). Biosurfactants: Opportunities for the development of a sustainable future. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 56, 101514.

Marcelino, P. R. F., Gonçalves, F., Jimenez, I. M., Carneiro, B. C., Santos, B. B., & da Silva, S. S. (2020). Sustainable production of biosurfactants and their applications. Lignocellulosic biorefining technologies, 159-183.

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

Markande, A. R., Patel, D., & Varjani, S. (2021). A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. Bioresource technology, 330, 124963.

Martins, P. C., Bastos, C. G., Granjeiro, P. A., & Martins, V. G. (2018). New lipopeptide produced by *Corynebacterium aquaticum* from a low-cost substrate. Bioprocess and biosystems engineering, 41, 1177-1183.

Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (2000). Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. Environmental science & technology, 34(23), 4923-4930.

- McClements, D. J., & Gumus, C. E. (2016). Natural emulsifiers—Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, 234, 3-26.
- Md, F. (2012). Biosurfactant: production and application. *J Pet Environ Biotechnol*, 3(4), 124.
- Mesbaiah, F. Z. (2015). Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques et production de biosurfactants par des souches bactériennes thermophiles isolées à partir d'un sol contaminé par le pétrole brut de la région de Hassi-messaoud. (Doctorat), Université Blida 1.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., & Sayadi, S. (2011). Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111(3), 525-536.
- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218.
- Moshtagh, B., Hawboldt, K., & Zhang, B. (2018). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source. *Environmental technology*.
- Mouafo, T. H., Mbawala, A., & Ndjouenkeu, R. (2018). Effect of different carbon sources on biosurfactants' production by three strains of *Lactobacillus* spp. *BioMed research international*, 2018.
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnology*, 24(11), 509-515.
- Mulligan, C. N., Cooper, D. G., & NEUFELD, R. J. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal of fermentation technology*, 62(4), 311-314.

N

- Nagarajaiah, S. B., & Prakash, J. (2011). Chemical composition and antioxidant potential of peels from three varieties of banana. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 4(1), 31-46.
- Najmi, Z., Ebrahimipour, G., Franzetti, A., & Banat, I. M. (2018). In situ downstream strategies for cost-effective bio/surfactant recovery. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(4), 523-532.

- Naser, H. M. (2015). Production, purification and characterization of biosurfactant from *Geobacillus thermoleovorans* and studying its antimicrobial and antitumor activity. (PhD), Al-Nahrain University
- Naughton, P., Marchant, R., Naughton, V., & Banat, I. M. (2019). Microbial biosurfactants: current trends and applications in agricultural and biomedical industries. *Journal of Applied Microbiology*, 127(1), 12-28.
- Nawawi, W. M. F. W., Jamal, P., & Alam, M. Z. (2010). Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production. *Bioresource technology*, 101(23), 9241-9247.
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Khan, S., & Khan, W. (2017). Variants of lipopeptides and glycolipids produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* cultured in different carbon substrates. *AMB Express*, 7(1), 1-13.
- Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., & Phang, L. Y. (2018). Culture medium development for microbial-derived surfactants production—an overview. *Molecules*, 23(5), 1049.

O

- Ohadi, M., Shahravan, A., Dehghannoudeh, N., Eslaminejad, T., Banat, I. M., & Dehghannoudeh, G. (2020). Potential use of microbial surfactant in microemulsion drug delivery system: a systematic review. *Drug design, development and therapy*, 541-550.
- Ouali, A. (2009). Production de biosurfactants par *Pseudomonas* sp. Application à la bioremédiation des milieux pollués par les hydrocarbures. Mémoire de Magister. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene. Alger. 68 p.
- Özdemir, G., Peker, S., & Helvacı, S. (2004). Effect of pH on the surface and interfacial behavior of rhamnolipids R1 and R2. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 234(1-3), 135-143.

P

- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 633-654.
- Panesar, P. S., & Kennedy, J. F. (2012). Biotechnological approaches for the value addition of whey. *Critical reviews in biotechnology*, 32(4), 327-348.
- Pereira, J. F., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A., & Rodrigues, L. R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259-268.

- Peypoux, F., Bonmatin, J., & Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 553-563.
- Pino-Herrera, D. O., Pechaud, Y., Huguenot, D., Esposito, G., van Hullebusch, E. D., & Oturan, M. A. (2017). Removal mechanisms in aerobic slurry bioreactors for remediation of soils and sediments polluted with hydrophobic organic compounds: An overview. *Journal of hazardous materials*, 339, 427-449.
- Pornsunthorntawe, O., Maksung, S., Huayyai, O., Rujiravanit, R., & Chavadej, S. (2009). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 using sequencing batch reactors: Effects of oil loading rate and cycle time. *Bioresource technology*, 100(2), 812-818.
- Pott, R. W., & Von Johannides, J. (2022). Process Development in Biosurfactant Production. *Biosurfactants for the Biobased Economy*, 195-233.

Q

- Qiu, Y., Xiao, F., Wei, X., Wen, Z., & Chen, S. (2014). Improvement of lichenysin production in *Bacillus licheniformis* by replacement of native promoter of lichenysin biosynthesis operon and medium optimization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 8895-8903.
- Quek, E., Ting, Y.-P., & Tan, H. M. (2006). *Rhodococcus* sp. F92 immobilized on polyurethane foam shows ability to degrade various petroleum products. *Bioresource technology*, 97(1), 32-38.

R

- Rahman, K., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology progress*, 18(6), 1277-1281.
- Rahman, P. K., & Gakpe, E. (2008). Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. *Biotechnology*.
- Rangarajan, V., & Clarke, K. G. (2015). Process development and intensification for enhanced production of *Bacillus* lipopeptides. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 31(1-2), 46-68.
- Ravindran, R., & Jaiswal, A. K. (2016). Microbial enzyme production using lignocellulosic food industry wastes as feedstock: a review. *Bioengineering*, 3(4), 30.
- Rehm, H., & Reiff. (1981). Mechanisms and Occurrence of Microbial Oxidation of Long-chain Alkanes. *Advances in Biochemical Engineering*, 19, 175-215.
- Rincón-Fontán, M., Rodríguez-López, L., Vecino, X., Cruz, J., & Moldes, A. (2020). Potential application of a multifunctional biosurfactant extract obtained from corn as

stabilizing agent of vitamin C in cosmetic formulations. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 16, 100248.

Robles-González, I. V., Fava, F., & Poggi-Varaldo, H. M. (2008). A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microbial Cell Factories*, 7, 1-16.

Rodrigues, L., Banat, I. M., Teixeira, J., & Oliveira, R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(4), 609-618.

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001). Natural roles of biosurfactants: Minireview. *Environmental microbiology*, 3(4), 229-236.

Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2002). Biosurfactants and oil bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, 13(3), 249-252.

Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1999). High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 154-162.

S

Saharan, B., Sahu, R., & Sharma, D. (2011). A review on biosurfactants: fermentation, current developments and perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011(1), 1-14.

Sajid, M., Khan, M. S. A., Cameotra, S. S., & Al-Thubiani, A. S. (2020). Biosurfactants: potential applications as immunomodulator drugs. *Immunology Letters*, 223, 71-77.

Sajna, K. V., Sukumaran, R. K., Jayamurthy, H., Reddy, K. K., Kanjilal, S., Prasad, R. B., & Pandey, A. (2013). Studies on biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 85-92.

Sakthipriya, N., Kumar, G., Agrawal, A., Doble, M., & Sangwai, J. S. (2021). Impact of biosurfactants, surfactin, and rhamnolipid produced from *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, on the enhanced recovery of crude oil and its comparison with commercial surfactants.

Salek, K., & Euston, S. R. (2019). Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. *Process Biochemistry*, 85, 143-155.

Samykanu, M., & Achary, A. (2017). Utilization of agro-industry residue for rhamnolipid production by *P. aeruginosa* AMB AS7 and its application in chromium removal. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 183, 70-90.

Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401.

- Sari, C. N., Fatimah, I. N., Hertadi, R., & Gozan, M. (2019). Processing of ozonized biodiesel waste to produce biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* for enhanced oil recovery. Paper presented at the AIP Conference Proceedings.
- Sarma, H., & Prasad, M. N. V. (2021). Biosurfactants for a sustainable future: production and applications in the environment and biomedicine: John Wiley & Sons
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 30(2), 127-144.
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 30(2), 127-144.
- Satpute, S., Bhawsar, B., Dhakephalkar, P., & Chopade, B. (2008). Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria.
- Sayad L., (2008). Qualité physicochimique et bactériologie des eaux de l'écosystème lacustre Lac des Oiseaux (wilaya de Taraf). Mémoire de Magister. Université Badji Mokhtar Annaba. Algérie. 125 p.
- Schulz, D., Passeri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V., . . . Gunkel, W. (1991). Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms. *Kieler Meeresforschungen-Sonderheft*, 8, 322-326.
- Sekhon, K. K., Khanna, S., & Cameotra, S. S. (2011). Enhanced biosurfactant production through cloning of three genes and role of esterase in biosurfactant release. *Microbial Cell Factories*, 10, 1-10.
- Sen, R., & Swaminathan, T. (2005). Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process Biochemistry*, 40(9), 2953-2958.
- Shaligram, N. S., & Singhal, R. S. (2010). Surfactin—a review on biosynthesis, fermentation, purification and applications. *Food technology and biotechnology*, 48(2), 119-134.
- Sharma, J., Sundar, D., & Srivastava, P. (2021). Biosurfactants: potential agents for controlling cellular communication, motility, and antagonism. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 893.
- Shilpa, M. (2021). Use of Natural Wastes for Biosurfactant (BS) and Bioemulsifier (BE) Production and their Applications – A Review. *Open access journal of microbiology & biotechnology*, 6(3), 1-17.
- Singh, P., Jain, R., Srivastava, N., Borthakur, A., Pal, D., Singh, R., . . . Mishra, P. K. (2017). Current and emerging trends in bioremediation of petrochemical waste: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 47(3), 155-201.

- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in microbiology*, 7, 2087.
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., & Crocker, D. (2008). Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. *Laboratory analytical procedure*, 1617(1), 1-16.
- Smyth, T. J., Perfumo, A., Marchant, R., Banat, I. M., Chen, M., Thomas, R. K., . . . Parry, N. J. (2010). Directed microbial biosynthesis of deuterated biosurfactants and potential future application to other bioactive molecules. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 1347-1354.
- Soussi, S., Essid, R., Hardouin, J., Gharbi, D., Elkahoui, S., Tabbene, O., . . . Limam, F. (2019). Utilization of grape seed flour for antimicrobial lipopeptide production by *Bacillus amyloliquefaciens* C5 strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187, 1460-1474.
- Spoeckner, S., Wray, V., Nimtz, M., & Lang, S. (1999). Glycolipids of the smut fungus *Ustilago maydis* from cultivation on renewable resources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 33-39.
- Srivastava, S., Mondal, M. K., & Agrawal, S. B. (2021). Biosurfactants for heavy metal remediation and bioeconomics. *Biosurfactants for a Sustainable Future: Production and Applications in the Environment and Biomedicine*, 79-98.
- Symmank, H., Franke, P., Saenger, W., & Bernhard, F. (2002). Modification of biologically active peptides: production of a novel lipoheptapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein engineering*, 15(11), 913-921.

T

- Thairu, Y., Nasir, I.A., Yahaya, U. 2014. Laboratory perspective of Gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, 1(4), 168-174.

U

- Udayangani, S. (2018). Difference Between Random Mutagenesis and Site Directed Mutagenesis. Consulté le 24 mai 2023, à l'adresse <https://www.differencebetween.com/difference-between-random-mutagenesis-and-vs-site-directed-mutagenesis/>

V

- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2016). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource technology*, 222, 195-201.
- Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource technology*, 232, 389-397.
- Varjani, S., Pandey, A., & Upasani, V. N. (2021). Petroleum sludge polluted soil remediation: Integrated approach involving novel bacterial consortium and nutrient application. *Science of the total environment*, 763, 142934.
- Varjani, S., Rakholiya, P., Ng, H. Y., Taherzadeh, M. J., Ngo, H. H., Chang, J.-S., . . . Bui, X.-T. (2021). Bio-based rhamnolipids production and recovery from waste streams: Status and perspectives. *Bioresource technology*, 319, 124213.
- Varjani, S., Upasani, V. N., & Pandey, A. (2020). Bioremediation of oily sludge polluted soil employing a novel strain of *Pseudomonas aeruginosa* and phytotoxicity of petroleum hydrocarbons for seed germination. *Science of the total environment*, 737, 139766.
- Vecino, X., Cruz, J., Moldes, A., & Rodrigues, L. (2017). Biosurfactants in cosmetic formulations: trends and challenges. *Critical reviews in biotechnology*, 37(7), 911-923.
- Veolia Water STI. (2012). Le traitement des effluents de la filière Lait Fromage - Revue IAA - la revue des industries agro alimentaires.
- Vera, E. C. S., de Azevedo, P. O. d. S., Domínguez, J. M., & de Souza Oliveira, R. P. (2018). Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. *Biochemical Engineering Journal*, 133, 168-178.
- Vieira, I. M. M., Santos, B. L. P., Ruzene, D. S., & Silva, D. P. (2021). An overview of current research and developments in biosurfactants. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 100, 1-18.

W

- Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Biosurfactants*, 1-13.
- Walter, V., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Biosurfactants*, 1-13.
- Wang, H., Tsang, C.-W., To, M. H., Kaur, G., Roelants, S. L., Stevens, C. V., . . . Lin, C. S. K. (2020). Techno-economic evaluation of a biorefinery applying food waste for sophorolipid production—a case study for Hong Kong. *Bioresource technology*, 303, 122852.

- Willenbacher, J., Mohr, T., Henkel, M., Gebhard, S., Mascher, T., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2016). Substitution of the native *srfA* promoter by constitutive *P_{veg}* in two *B. subtilis* strains and evaluation of the effect on Surfactin production. *Journal of Biotechnology*, 224, 14-17.
- Wu, J., Zhang, J., Zhang, H., Gao, M., Liu, L., & Zhan, X. (2019). Recycling of cooking oil fume condensate for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* WB505. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42, 777-784.
- Wu, Q., Zhi, Y., & Xu, Y. (2019). Systematically engineering the biosynthesis of a green biosurfactant surfactin by *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic engineering*, 52, 87-97.

Y

- Yadav, P. (2023). Difference Between Interfacial Tension and Surface Tension. Consulté le 10 juin 2023, à l'adresse <https://askanydifference.com/fr/difference-between-interfacial-tension-and-surface-tension/>
- Yalaoui-Guellal, D., Brahmi, F., Touati, A., De Champs, C., Banat, I. M., & Madani, K. (2018). Production of Biosurfactants by Hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed Sediments of Bejaia in Algeria. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37(1), 189-195.
- Yalaoui-Guellal, D., Fella-Temzi, S., Djafri-Dib, S., Brahmi, F., Banat, I. M., & Madani, K. (2020). Biodegradation potential of crude petroleum by hydrocarbonoclastic bacteria isolated from Soummam wadi sediment and chemical-biological proprieties of their biosurfactants. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 184, 106554.
- Yalaoui-Guellal, D., Fella-Temzi, S., Djafri-Dib, S., Sahu, S. K., Irorere, V. U., Banat, I. M., & Madani, K. (2021). The petroleum-degrading bacteria *Alcaligenes aquatilis* strain YGD 2906 as a potential source of lipopeptide biosurfactant. *Fuel*, 285, 119-112.
- Yañez-Ocampo, G., Somoza-Coutiño, G., Blanco-González, C., & Wong-Villarreal, A. (2017). Utilization of agroindustrial waste for biosurfactant production by native bacteria from chiapas. *Open agriculture*, 2(1), 341-349.
- Yea, D., Jo, S., & Lim, J. (2019). Synthesis of eco-friendly nano-structured biosurfactants from vegetable oil sources and characterization of their interfacial properties for cosmetic applications. *MRS Advances*, 4, 377-384.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 339-347.

Z

- Zenati, B. (2018). Biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines: Application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole.
- Zhang, L., Pemberton, J. E., & Maier, R. M. (2014). Effect of fatty acid substrate chain length on *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 monorhamnolipid yield and congener distribution. *Process Biochemistry*, 49(6), 989-995.
- Zheng, H., & Wang, L. (2013). Banana peel carbon that containing functional groups applied to the selective adsorption of Au (III) from waste printed circuit boards.
- Zhi, Y., Wu, Q., & Xu, Y. (2017). Production of surfactin from waste distillers' grains by co-culture fermentation of two *Bacillus amyloliquefaciens* strains. *Bioresource technology*, 235, 96-103.
- Zhou, J., Xue, R., Liu, S., Xu, N., Xin, F., Zhang, W., . . . Dong, W. (2019). High di-rhamnolipid production using *Pseudomonas aeruginosa* KT1115, separation of mono/di-rhamnolipids, and evaluation of their properties. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 245.

Annexes

Annexe N° 01 : Appareillage, petites matériels, verrerie et réactifs utilisés :

Appareillages	Petits matériels et verrerie	Réactifs
Agitateur-plaque chauffante	Béchers	HCl
Autoclave	Boîtes de pétri	DNS
Etuve	Boîtes en verre	TDA
Bain marie	Eprouvettes de 100 ml	NaOH
Balance analytique	Erlenmeyer de 1000ml	Eau oxygénée
Bec bunsen	Flacons de 250 ml	Eau distillée
Incubateur orbital	Micropipettes	Poudre de zinc
Centrifugeuse	Pincés	Ethanol
PH mètre	Porte-tubes à essais	Glucose
Réfrigérateur	Papier absorbant	Alpha naphthol
Vortex	Papier aluminium	Nitrites 1 & 2
Microscope	Papier Cellophane Transparent	Alcool
Tamiseur	Pipette pasteur	Les colorants
Spectrophotomètre	Tube conique	Lugol
Lyophilisateur	Tube à essai	Fuchsine
Tensiomètre (GIBERTINI)	Spatule	Violet de gentiane
Spectrophotomètre Infrarouge à Transformée de Fourier	Passoir	
Moulin à café	Tubes à Eppendorf	
	Entonnoirs	
	Lames et lamelle	
	Cuvette de spectrophotomètre	

Annexe N° 02 : Composition des milieux de culture utilisés :✓ **Milieu de gélose nutritif (g/l)**

Poudre de gélose nutritive..... 28
Eau distillée1000

✓ **Milieu Salé Minéral (MSM)**

NaCl.....30g
KH₂PO₄..... 2,0g
NH₄NO₃.....1,0g
Na₂HPO₄.....3,0g
MgSO₄.7H₂O.....0,7g
Solution de traces d'éléments.....1,0 ml
Eau distillée1000 ml

pH = 7,2 ± 0,2

✓ **Solution de traces d'éléments Minéraux**

ZnSO₄.7H₂O.....10mg
CuSO₄.H₂O..... 0,50mg
MnSO₄H₂O..... 0,50mg
CaCL₂.....20mg
FeCL₃..... 30mg
Eau distillée qsp..... 1000ml

✓ **Citrate de Simmons**

Citrate de sodium.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Phosphate mono-ammonique.....	1g
Phosphate dipotassique.....	1g
Bleu de bromothymol.....	0,08g
Agar.....	15g
pH final : $6,8 \pm 0,2$	

✓ **Urée-indole**

L-Tryptophane.....	3g
Phosphate bipotassique.....	1g
Phosphate monopotassique.....	1g
Chlorure de sodium.....	5g
Urée.....	20g
Alcool à 95°.....	10ml
Rouge de phénol à 1 %.....	2,5ml

✓ **Gélose au sang frais**

Peptone.....	16g/l
D-glucose.....	0.5g/l
Extrait de levure.....	2g/l
Chlorure de sodium.....	7,0g/l
Agar.....	12.0g/l
Eau distillé.....	1000ml
Sang frais	5%
pH final : $7,4 \pm 0,2$	

✓ **Kligler-Hajna**

Peptone	20g
Lactose	10g
Extrait de levure.....	3g
Extrait de viande.....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Glucose.....	1g
Thiosulfate de sodium	0.3g
Fer (III) ammonium citrate.....	0.3g
Rouge de phénol	25mg
Agar.....	11g
Eau distillé.....	1000ml
pH final : $7,4 \pm 0,2$	

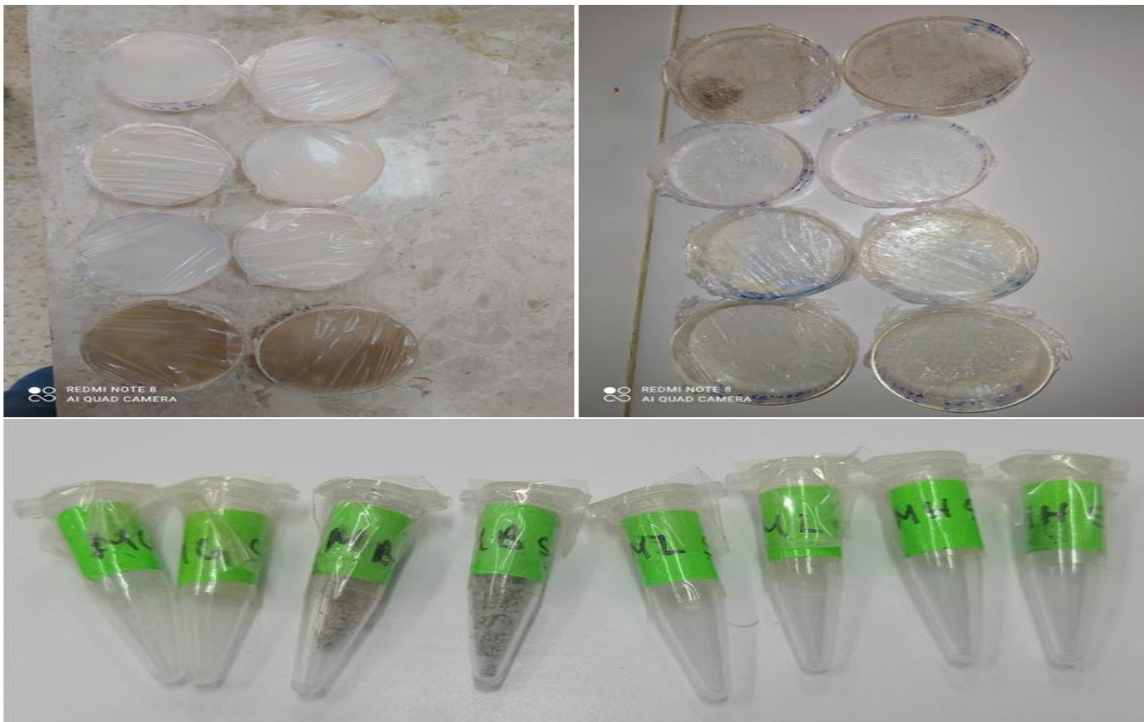
Annexe N°03

1. Préparation de DNS

On mélange la solution 01 et la solution 02 et on ajoute de l'eau distillée à 1 L.

Solution 01	Solution 02
Tartrate de sodium.....300g	DNS.....10g
Potassium.....300g	Soude à 2N.....200ml
Eau distillée.....500ml	

2. Les résultats d'extraction des biosurfactants après lyophilisation



Résumé : En raison de leur coût peu élevé et de leur disponibilité abondante, cette étude a utilisé quatre déchets agro-industriels comme source de carbone pour la production de biosurfactants : huile de friture, pelures de bananes, coquilles d'œufs, lactosérum et le glucose comme un substrat de référence. Deux souches bactériennes hydrocarbonoclastes (S1 et S2) productrices de biosurfactants ont été utilisées. L'identification microscopique a révélé que les deux souches sont bactéries à Gram positif avec une morphologie en forme de coque pour la souche 1 et en forme de bâtonnet pour la souche 2. La production de biosurfactants dans les quatre milieux a été estimée par des tests qualitative et quantitatif à savoir l'activité hémolytique, le test de déplacement de l'huile (DDH), l'activité d'émulsification (E24%), la tension superficielle et le dosage des sucres réducteurs (DNS). Selon les résultats, aucune des deux souches ne présente d'activité hémolytique. Les souches S1 et S2 ont présenté un indice d'émulsification maximal à 53% pour la souche 2 dans le milieu de glucose. Les résultats de déplacement d'huile, on témoigne une activité de surface élevée avec des diamètres de zone allant de 1,25cm à 7,75cm. La tension superficielle a été réduite à 23-24 mN/m par les biosurfactants produits dans les échantillons. Après l'extraction par précipitation acide, la souche 1 a produit le rendement en biosurfactants le plus élevé en lactosérum enrichi avec la poudre des coquilles d'œufs (5,94mg/ml). Les spectres d'absorption infrarouge ont mis en évidence la présence simultanée d'une chaîne aliphatique et de groupes peptidiques dans les biosurfactants produits.

Mots clé : Biosurfactants, Déchets agro-industriels, Indice d'émulsification (E24), Test de déplacement d'huile (DDH), la tension superficielle.

Abstract: Due to their low cost and abundant availability, this study used four agro-industrial wastes as carbon sources for the production of biosurfactants: frying oil, banana peels, egg shells, whey, and glucose substrate as a reference. Two hydrocarbonoclast bacterial strains (S1 and S2) producing biosurfactants were used. Microscopic identification revealed that both strains are Gram-positive bacteria with rounded shaped morphologies for strain 1 and rod-shaped morphologies for strain 2. The production of biosurfactants in the four media was estimated by qualitative and quantitative tests, i.e., hemolytic activity, oil displacement test (DDH), emulsification activity (E24%), surface tension, and dosage of reducing sugars (DNS). According to the results, neither of the two strains exhibits hemolytic activity. S1 and S2 strains exhibited a maximum emulsification index of 53% or strain 2 in the glucose medium. The oil displacement results show high surface activity with zone diameters ranging from 1.25 cm to 7.75 cm. The surface tension was reduced to 23–24 mN/m by the biosurfactants produced in the samples. After extraction by acid precipitation, strain 1 produced the highest biosurfactants yield in whey enriched with eggshell powder 5.94 mg/ml. Infrared absorption spectra show the simultaneous presence of aliphatics chain and peptide groups in the biosurfactants produced.

Keywords: Biosurfactants, Agro-industrial waste, Emulsification index (E24), Oil displacement test (DDH), Surface tension.

مخلص: نظرًا لتكلفتها المنخفضة وتوافرها الوفير، استخدمت هذه الدراسة أربعة نفايات زراعية صناعية كمصدر للكربون لإنتاج المواد الخافضة للتوتر البيولوجي: زيت القلي، وقشور الموز، وقشور البيض، ومصل اللبن، والجلوكوز كركيزة مرجعية. تم استخدام سلالتين بكتيريتين (S1 و S2) منتجتان لخافضات التوتر السطحي الحيوي. كشف التحديد المجهرى أن كلا السلالتين عبارة عن بكتيريا موجبة الجرام ذات شكل دائري للسلالة 1 وشكل عصيات للسلالة 2. تم تقدير إنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي في جميع الوسائط الأربعة من خلال الاختبارات النوعية والكمية، وهي نشاط انحلال الدم، واختبار إزاحة الزيت، ونشاط الاستحلاب، والتوتر السطحي وتقييم السكريات المختزلة. أشارت النتائج إلى أنه لم تظهر أي من السلالتين نشاطًا انحلالًا للدم. أظهر السلالتان S1 و S2 مؤشر استحلاب أقصى بنسبة 53% للسلالة 2 في وسط الجلوكوز. تظهر نتائج إزاحة الزيت نشاطًا سطحيًا مرتفعًا يتراوح أقطار المنطقة من 1.25 سم و 7.75 سم. تم تقليل التوتر السطحي من 47.29 مللي نيوتن/م إلى 23-24 مللي نيوتن/م بواسطة المواد الخافضة للتوتر السطحي التي تم إنتاجها في العينات. بعد الترسيب الحمضي، أنتجت السلالة 1 أعلى محصول خافض للتوتر البيولوجي في مصلى اللبن المخصب بمسحوق قشر البيض، 5,94 مجم/مل. تُظهر أطياف امتصاص الأشعة تحت الحمراء الوجود المتزامن لسلسلة الأليفاتية ومجموعات الببتيد في المواد الخافضة للتوتر السطحي الحيوية المنتجة.

الكلمات المفتاحية : المواد الخافضة للتوتر السطحي، النفايات الزراعية والصناعية، مؤشر الاستحلاب، اختبار إزاحة الزيت، التوتر السطحي.