

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/F.SNV.ST/DEP.BIO/2022

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

DJOUGHFALI Halima et GACI Madjida

Thème

*Valorisation des sous-produits agro-alimentaire pour la
production des biosurfactants par des souches bactériennes*

Soutenu le : 06 /07 / 2022

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme. MOUDACHE Messaad

MCA.

Univ. de Bouira

Présidente

Mme. MOURI-HADIDI Lila

MCB.

Univ. de Bouira

Examinatrice

Mme. YALAOUI-GUELLAL Drifa

MCA.

Univ. de Bouira

Promotrice

Année Universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous remercions DIEU pour nous avoir donné la force d'aller jusqu'au bout dans ce travail.

*En premier lieu, nous tenons à remercier notre promotrice madame **YALAOUI-GUELLAL Drifa** Maître de conférences A à l'université Akli Mohand Oulhadj Bouira pour la confiance qu'elle nous accordée en acceptant d'encadrer ce travail, pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience, pour ces multiples conseils et pour toutes les heures qu'elle a consacrées à diriger ce mémoire.*

Notre vif remerciement pour les membres de jury :

*Mme **MOUDACHE Messaad** Maître de conférences A à l'Université de Bouira qui nous a fait l'honneur de présider ce jury, Mme **MOURI-HADIDI Lila**, Maître de conférences B à l'université de Bouira pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.*

Nous remercions infiniment nos amis, sœurs et collègues de travail, l'équipe du service des laboratoires universitaire de la faculté SNVST pour leur aide leur soutien et encouragement merci pour vous tous d'être toujours là à nos cotés.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

Ma chère Grande mère loumima *je t'aime beaucoup*

Ma chère maman *la personne la plus chère à mon cœur qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie.*

Mon cher père, *Les mots me manquent pour exprimer toute ma fierté qui n'égale que l'accomplissement total de ton devoir de père. Que ce travail soit une récompense pour tout ce que vous avait fait pour moi.*

Mes chers frères Oussama et Sohaib *Je ne peux exprimer à tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous*

Ma chère sœur Ranime *je t'aime beaucoup*

Ma chère copine et binôme Madjida, *Qui est pour moi une vraie sœur.*

Je dédie tous ceux qui m'ont aidé mêmes avec mot : Wissam, lina, Kawther, Fatima et les doctorants Yacine et Imane.

Djoghilafi Halima

Dédicace

Avec un énorme plaisir, un cœur ouvert et immense joie que Je dédie ce travail :

A mes chers parents

Laid et Zahwa

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'affection et l'amour que j'éprouve envers vous. Puis ce travail constitue une légère compensation pour tous les nobles sacrifices que vous avez imposés pour assurer mon bien être et mon éducation.

A mes chères sœurs

Manel et Roumaissa

A mes anges

Ayoub, Asma et Adem

A tous mes cousins, amis, collègues, que j'apprécie beaucoup

Mourad, Ghilas, Nassima, Ouissem, Salma, Ahmed, Meriem, Chahra, Thileli, Billal, Yasmin, Numidia, Amine, Said, Hdjila, Dalal, Sara, Salha, Cylia, lina, Wissam, Ines, Hanane, Ilham.

A mon binôme *qui a travaillé avec moi tout au long de ce travail Halima.*

Je dédie les doctorants Mr Yacine et M^{elle} Imane pour leurs conseils et orientations qu'ils nous ont donnés.

ÇACI Madjida

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Remerciements | |
| Dédicaces | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des figures | |
| Liste des abréviations | |
| Introduction..... | 1 |
| <i>Partie 1 : Synthèse bibliographique</i> | |
| Chapitre I. Les sous-produits agroalimentaires et les voies de valorisation..... | 3 |
| I.1. Définition des sous-produits agroalimentaires | 3 |
| I.2. Classification des sous-produits agroalimentaires | 4 |
| I.2.1. Les sous-produits animaux..... | 4 |
| I.2.2. Les sous-produits végétaux..... | 4 |
| I.3. Composition des sous-produits agroalimentaires..... | 6 |
| I.3.1. Pelure de pomme de terre..... | 7 |
| I.3.2. Grignons d'olives..... | 7 |
| I.3.3. Tégument de chêne vert (<i>Quercus ilex</i>)..... | 7 |
| I.4. Valorisation des sous-produits agro-alimentaires..... | 8 |
| I.4.1. Types de la valorisation | 8 |
| Chapitre II. Généralités sur les biosurfactants..... | 14 |
| II.1. Définition des surfactants et biosurfactants..... | 14 |
| II.2. Origine des biosurfactants..... | 14 |
| II.3. Classification des biosurfactants..... | 14 |
| II.3.1. Selon la composition chimique..... | 14 |
| II.3.1.1. Les glycolipides..... | 14 |
| II.3.1.2. Les lipopeptides | 15 |
| II.3.1.3. Les Phospholipides..... | 16 |
| II.3.1.4. Les biosurfactants polymériques..... | 16 |
| II.3.1.5. Les biosurfactants particulier..... | 17 |
| II.3.2. Selon le poids moléculaire..... | 18 |
| II.3.2.1. Faible poids moléculaire..... | 18 |
| II.3.2.2. Haut poids moléculaire..... | 18 |
| II.4. Les avantages des biosurfactants..... | 18 |
| II.4.1. Faible toxicité..... | 18 |
| II.4.2. Disponibilité de matières premières..... | 18 |
| II.4.3. Tolérance aux différents paramètres physico-chimiques..... | 18 |
| II.4.4. Activité de surface et l'interface..... | 19 |
| II.4.5. Biodégradabilité | 19 |
| II.5. Applications des biosurfactants..... | 20 |
| <i>Partie 2 : Procédures expérimentales</i> | |
| Chapitre III : Matériels et méthodes..... | 21 |
| III.1. Matériel | 21 |
| III.1.1. Matériel biologique..... | 21 |

| | |
|---|-----------|
| III.1.2. Matériel non biologique..... | 21 |
| III.2. Méthodes..... | 21 |
| III.2.1. Revivification des souches..... | 21 |
| III.2.2. Vérification de la pureté des souches..... | 22 |
| III.2.3. Etude des caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches..... | 22 |
| III.2.3.1. Aspect macroscopique | 22 |
| III.2.3.2. Etude microscopique..... | 22 |
| III.2.3.3. Tests biochimiques..... | 24 |
| III.2.4. Préparation de poudres issues des sous-produits agroalimentaires..... | 27 |
| III.2.5. Préparation des milieux de production de biosurfactants..... | 28 |
| III.2.6. Suivi de la production des biosurfactants..... | 28 |
| III.2.6.1. Détermination de la croissance bactérienne..... | 29 |
| III.2.6.2. Estimation de la production des biosurfactants..... | 30 |
| III.2.6.3 Réduction des sucres par la méthode de DNS..... | 31 |
| III.2.7. Extraction et purification des biosurfactants..... | 32 |
| III.2.7.1. Extraction par précipitation..... | 32 |
| III.2.7.2. Extraction par solvant | 32 |
| Chapitre IV. Résultats et discussion | 33 |
| IV.1. Revivification et vérification la pureté des souches | 33 |
| IV.2. Etude microbiologique des souches S1 et S2..... | 33 |
| IV.2.1. Aspect macroscopiques des souches | 33 |
| IV.2.2. Aspect microscopique et biochimique..... | 34 |
| IV.2.3. Test d'hémolyse..... | 35 |
| IV.3. Suivi de la production de biosurfactants..... | 36 |
| IV.3.1. Détermination de la croissance bactérienne..... | 36 |
| IV.3.2. Suivi de l'activité d'émulsification (E24)..... | 39 |
| IV.3.3. Test de déplacement d'huile (DDH)..... | 40 |
| IV.3.4. Test des sucres réducteurs par la DNS..... | 42 |
| IV.4. Extraction des biosurfactants | 43 |
| Conclusion..... | 45 |
| Références bibliographiques..... | 46 |
| Annexes | |
| Résumé | |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 01 : Composition chimiques des pelures de pomme de terre..... | 06 |
| Tableau 02 : Composition chimique de grignons d'olives..... | 07 |
| Tableau 03 : Avantages et inconvénients de la méthanisation..... | 10 |
| Tableau 04 : Différents domaines d'application des biosurfactants..... | 10 |
| Tableau 05 : Les différents caractères macroscopiques des souches S1 et S2 | 20 |
| Tableau 06 : Résultats des différents tests biochimiques des souches S1 et S2..... | 33 |
| Tableau 07 : Résultats de rendement des biosurfactants par différents milieux et souches bactériennes S1 et S2 après extraction par solvant..... | 34 |
| Tableau 08 : Résultats de rendement des biosurfactants par différents milieux et souches bactériennes S1 et S2 après extraction par précipitation | 43 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 01 : Schéma représentatif du processus de la production des produits alimentaire..... | 03 |
| Figure 02 : Sous-produits des fruits et légumes..... | 05 |
| Figure 03 : Les pulpes de betterave hydratée..... | 05 |
| Figure 04 : Schéma récapitulatif des types de la valorisation..... | 08 |
| Figure 05 : Schéma représentatif des étapes de la méthanisation..... | 09 |
| Figure 06 : Schéma récapitulatif le cycle de compostage..... | 11 |
| Figure 07 : Structure d'un biosurfactants et formation d'une micelle..... | 13 |
| Figure 08 : Structure chimique de rhamnolipide..... | 14 |
| Figure 09 : Structure des formes sophorolipidiques | 15 |
| Figure 10 : Structure chimique du tréhalolipide..... | 15 |
| Figure 11 : Structure chimique d'une molécule de lipopeptide..... | 16 |
| Figure 12 : Structure chimique d'un phosphatidyl-éthanol-amine..... | 16 |
| Figure 13 : Structure chimique d'un emulsan produit par divers espèces d' <i>Acinetobacter</i> | 17 |
| Figure 14 : les vésicules membranaires produites par <i>Actinobacter sp</i> observées par microscopie électronique, en utilisant la technique de coloration négative..... | 17 |
| Figure 15 : Partage des tensioactifs (micelles) entre un milieu gras et un milieu aqueux..... | 19 |
| Figure 16 : Vérification de la pureté des souches..... | 22 |
| Figure 17 : Les étapes de la coloration du Gram..... | 23 |
| Figure 18 : Enchaînement des étapes de test catalase..... | 24 |
| Figure 19 : Etapes de réalisation du test d'hémolyse | 27 |
| Figure 20 : Préparation de la poudre de pomme de terre..... | 28 |
| Figure 21 : la préparation des milieux MSM avec différentes sources de carbone et mesure du PH de milieu MSM | 29 |
| Figure 22 : La fermentation des milieux dans un fermenteur | 30 |
| Figure 23 : Schéma représentatif de principe de test d'E24..... | 30 |
| Figure 24 : Suivi d'étapes du test d'émulsification (E24)..... | 31 |
| Figure 25 : Test déplacement d'huile | 31 |
| Figure 26 : Résultats de la vérification de la pureté des souches | 33 |
| Figure 27 : Résultats de test d'hémolyse sur les deux souches..... | 35 |

| | |
|---|----|
| Figure 28 : croissance bactérienne au cours de la fermentation..... | 36 |
| Figure29 : Evaluation d'indice d'émulsification en fonction de temps..... | 39 |
| Figure 30 : Evaluation de déplacement d'huile en fonction de temps durant la fermentation..... | 41 |
| Figure 31 : Evaluation de concentration des sucres réducteurs en fonction de temps..... | 42 |

Liste des abréviations

ADEME : acronyme de l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie.

ADH : l'arginine di hydrolase

BBS : Biomasse bactérienne sèche

BN : Bouillon Nutritif

BS : Biosurfactants

CE : Communauté Européenne

CCE : Communauté Economique Européenne

CMC : Concentration Micellaire

DDH : Déplacement d'huile

DNS : l'acide dinitrosalicylique

E₂₄ : l'indice d'émulsion après 24h

Env. : Environnements

GN : Gélose Nutritive

HE : Hauteur d'émulsion

HT : Hauteur totale

LDC : lysine décarboxylase

MEPT : Milieu des épiluchures de pomme de terre

MG : Milieu de glucose

MGO : Milieu grignons d'olives

MSM : Milieu Minimum Salé

MT : Milieu de tégument

ODC : l'ornithine décarboxylase

ONPG : l'ortho-nitro-phényl-galactoside

S : Souche

TDA : tryptophane désaminase

VP : Voges-Proskauer

Introduction

Le but de l'industrie agroalimentaire est de produire des denrées alimentaires destinés à l'homme, mais toujours il y a des restes (sous-produit) non consommables, comme les épilucheurs des fruits et des légumes, la coque des œufs.....etc. Dernièrement les industries génèrent des grandes quantités des sous-produits, qui peuvent être des composés à valeur, même le plan d'action de l'Union Européenne (UE) pour l'économie circulaire visant à réduire le gaspillage alimentaire par la méthode de valorisation (énergétique, en alimentation animal.....etc. ([Chapoutot et al.,2019](#)), mais aussi dans la production des biosurfactants.

Ces tensioactifs sont d'origine biologique, synthétisés par les microorganismes (bactéries et levures) qui poussent sur des substrats variés. Les biosurfactants les plus étudiés et les plus utilisés sont d'origine glycolipidique et lipopeptidique ([Haba et al., 2003](#)).

Le principal obstacle à l'utilisation des biosurfactants est le coût élevé de leur production. Actuellement, il est possible de les réduire grâce à l'utilisation des substrats moins couteux à savoir la valorisation des sous-produits et les déchets des industries. Les déchets agricoles et autres déchets (huile moteur usagée,.....etc.) de diverses industries peuvent être utilisés pour réduire le coût de production des biosurfactants d'une part et minimiser la quantité de déchets à traiter d'autre part ([Makkar et Cameotra., 2002](#)).

Les recherches dans ce domaine sont augmentées ces dernières années en raison de son utilisation dans différents secteurs. Parmi ces secteurs nous citons : l'agroalimentaire, la cosmétique, la médecine, l'agriculture, les détergents, la fabrication de textiles, le traitement des métaux, l'industrie pétrolière et la bioremédiation de sites contaminés par les hydrocarbures, grâce à leur capacité d'émulsification et de solubilisation,.....etc. ([Santos et al., 2016](#)).

Dans cette optique notre étude a été menée, Pour cela, ce travail est divisé en deux parties :

La première partie est une synthèse bibliographique qui comporte deux chapitres :

Le premier chapitre est consacré aux différentes connaissances relatives au sous-produit agroalimentaire, leur classification et les méthodes de valorisation. Le deuxième chapitre présent un rappel sur les biosurfactants, leurs classification et domaine d'utilisation.

La deuxième partie est réservée aux différentes procédures expérimentales qui sont subdivisées en deux chapitres : le troisième chapitre traite les matériels et méthode utilisé au

cours de cette recherche tel que la production des biosurfactants sur les substrats agro-alimentaires, et suivi cette production par quelque test et l'identification des bactéries productrice de biosurfactants. Le quatrième chapitre est consacré aux résultats et leurs discussions.

Nous terminons cette étude par une conclusion suivie par une liste des références bibliographique et liste des annexes.

Partie I:
Recherche bibliographique



Chapitre I

Chapitre I

I. Les sous-produits agroalimentaires et les voies de valorisation

I.1. Définition des sous-produits agroalimentaires

L'agroalimentaire signifie un ensemble des activités concernant les produits destinés (végétaux et animaux) à l'alimentation humaine (Figure 01). Avec la première révolution industrielle britannique, l'industrie agroalimentaire consiste à la production des produits finis à partir des matières brutes, suivit d'une revente au transformateurs secondaires artisanaux (Martory et Capul, 2005).

Un sous-produit : est un produit résiduel accidentel qui apparaît durant le processus de fabrication, de transformation ou de distribution d'un produit fini. Il peut être utilisé directement ou bien constituer un ingrédient d'un autre processus de production en vue de la fabrication d'un autre produit fini (Chapoutot et al., 2019).

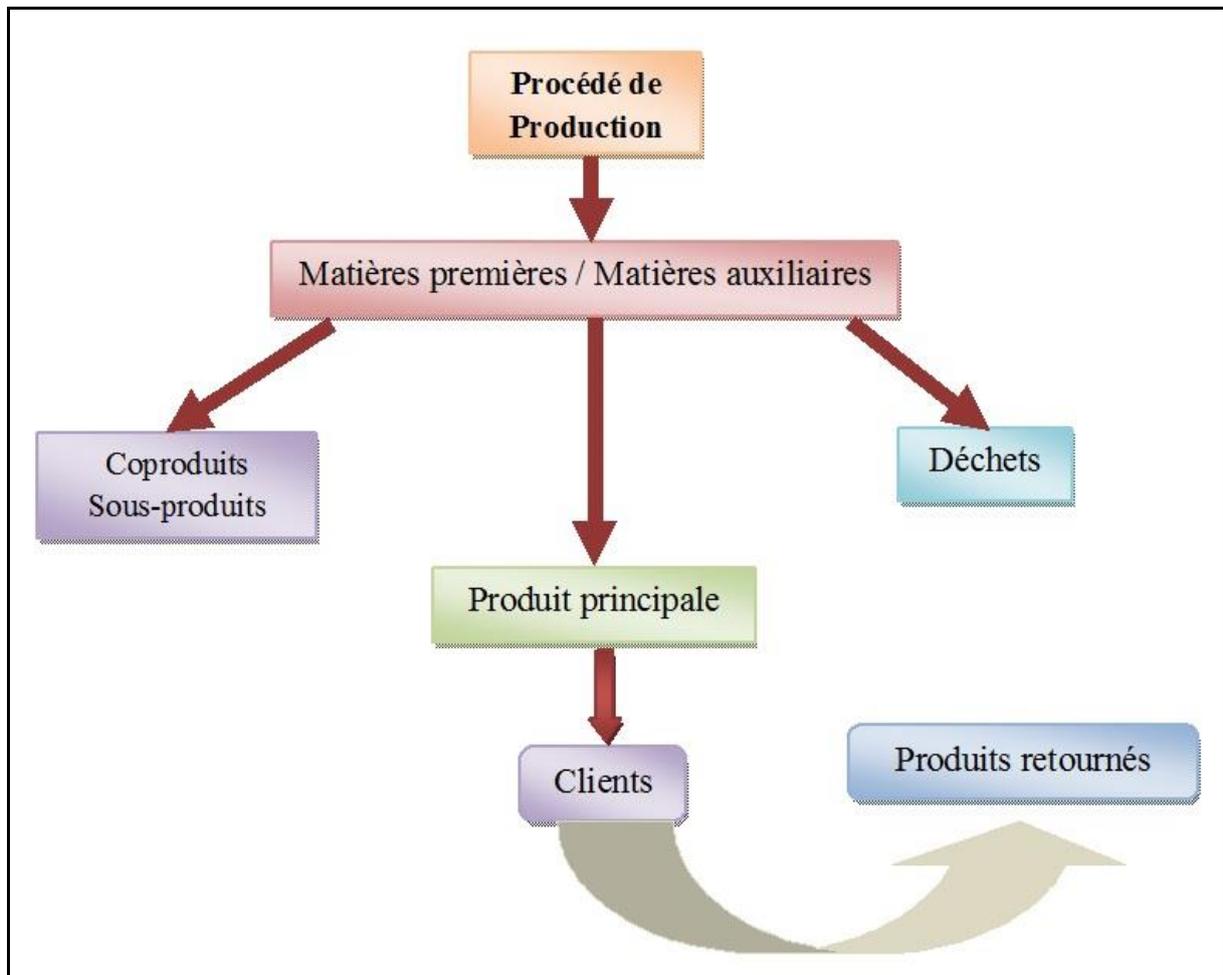


Figure 01. Schéma représentatif du processus de la production des produits alimentaire (Lecompte, 2017 ; Galliard, 2020).

Un coproduit : est une matière, qui n'est ni un produit, ni un résidu, ni un déchet, créée au cours du même processus de fabrication et en même temps que le produit principal. Le produit fini principal et le coproduit doivent tous les deux répondre à des spécifications de caractéristiques, et chacun est apte à être utilisé directement pour un usage particulier (Chapoutot et al., 2019).

I.2. Classification des sous-produits agroalimentaires

I.2.1. Les sous-produits animaux

Les sous-produits animaux, sont des produits d'origine animale ou d'autres produits obtenus à partir d'autres animaux (viandes, œufs, lait...) et les denrées alimentaires dans lesquelles ces produits sont présents, tels que la soupe de poisson, les biscuits...etc., qui ne sont pas destinés à la consommation humaine. Ils sont généralement des déchets d'origine animale mais au même temps d'anciennes denrées alimentaires. Ils sont classés en 3 catégories en fonction de risques qu'ils représentent (Communauté Européenne, 2009).

a. Catégorie 1 : Ce sont des sous-produits, qui présentent un haut risque pour la santé publique, ces sous-produits ne doivent pas être consommés mais ils sont transformés en combustible et incinérés avec récupération d'énergie de combustion tel que les déchets de cuisine de table (Plassard, 2020).

b. Catégorie 2 : Ce sont des produits de métabolisme animal, ils sont utilisés dans la production de biogaz (le contenu de l'appareil digestif, poussins morts dans l'œuf, fœtus). Les risques sanitaires sont moins importants que pour les sous-produits de catégorie 1 (Plassard, 2020).

c. Catégorie 3 : Ils présentent un faible risque sanitaire ils peuvent être utilisés en alimentation animale, tels que les os, les plumes, le sang, la viande...etc. (Plassard, 2020).

I.2.2. Les sous-produits végétaux

La filière des sous-produits végétaux englobe plusieurs classes :

a. Les sous-produits issus des céréales

Les cannes de maïs et les pailles de céréales représentent 90% de gisement de sous-produits exprimé en matière sèche. Les pailles de céréales sont des aliments qui remplacent les fourrages grossiers dans l'alimentation animale (Ademe, 2000).

b. Les sous-produits des fruits et légumes

Cette filière génère des sous-produits nombreux et variés. La majorité d'entre eux est utilisée pour la nourriture des ruminants avec un intérêt alimentaire très variable. Tels que les sous-produits de pomme de terre, pulpes crues, pelures...etc. (Figure 02. a). Ces sous-produits sont utilisés en alimentation animale, ils entrent rarement dans la fabrication d'aliment composé (Ademe, 2000). Les sous-produits des pommes, les noix des pommes, les épiluchures...etc. (Figure 02. b). Ce sont une source végétale plus riche en composés bioactifs qui sont bénéfiques pour la santé humaine (Grigoras, 2012).



Figure 02. Sous-produits des fruits et légumes, a. sous-produit des olives (Galliard, 2020), b. sous-produits végétaux (Isara, 2020).

c. Les sous-produits de l'industrie sucrière

Ils sont issus de la fabrication de sucre à partir de betterave, tel que les pulpes de betterave (Figure 03), ils sont riches en énergie. Ces sous-produits sont utilisés en alimentation animale après valorisation (Ademe, 2000).



Figure 03 : Les pulpes de betterave hydratée (Heuzé et al., 2020).

I.3. Composition des sous-produits agroalimentaires

Les sous-produits agroalimentaires (les noyaux, les épluchures...etc.) sont bénéfique pour la santé humaine bien que les fruits et les légumes lui mêmes. On cite la pelure de courgette qui est intéressante pour les maladies cardiovasculaires, par sa richesse en potassium, elle présente une excellente digestibilité (Favier et al.,1995) même dans le domaine cosmétique, elles sont utilisés, comme les grains de raisin qui sont riches en oméga 6 (Cabanis et al., 1998).

I.3.1. Pelure de pomme de terre

Pomme de terre est un tubercule comestible produit par l'espèce *Solanum tuberosum*, appartenant à la famille des solanacées Elle est une source importante de glucides, protéines et de vitamines ses qualités nutritives et sa facilité de culture font qu'elle est devenue l'un des aliments de base de l'humanité. Par conséquence le gaspillage quotidienne des pommes de terre à crier l'idée de la valorisation de ses épluchures (Juz.et Bukasov, 2008). La composition chimique des épluchures de pomme de terre est présentée dans le tableau 1.

Tableau 1 : composition chimiques des pelures de pomme de terre (Arapoglou et al., 2009)

| Composition | Concentration (%) |
|-------------|-------------------|
| Humidité | 85.1 |
| Protéines | 2.3 |
| Lipides | 0.1 |
| Glucides | 12.4 |
| Amidon | 7.8 |
| Fibres | 2.5 |

Les pelures de pomme de terre sont largement utilisés dans différents domaines tels que :

*Utilisation des pelures de pomme de terre (PPT) dans le traitement des eaux contaminées, pour l'élimination de certains polluants organiques tels que les colorants textiles (Bouhadjra et al.,2017).

* La production d'acide citrique (Kouassi et al., 2017).

*La synthèse des bioplastique à partir d'amidon qui se trouve dans la pomme de terre (Davidovic ,2006 ; Wertz, 2011).

I.3.2. Grignons d'olives

L'olivier est l'un des arbres fruitiers qui appartient à la famille de l'oléacée au genre *olea*, et à partir des olives cultivés il ya la fabrication des olives de table et l'huile d'olive (Botineau, 2010). La production de ce dernier se traduit par la présence de grignons qui sont les résidus solides résultant de l'extraction d'huile (Azri et al., 1999).

La composition chimique des grignons d'olive (*Olea europaea*) est présentée dans le tableau 2, elle est variée dans de très larges limites. Elle dépend des facteurs intrinsèques de fruit (stade de maturité), procédé de l'extraction de l'huile (Nefzaoui, 1985).

Tableau 2. Composition chimique de grignons d'olives (Nefzaoui, 1984).

| Composition | Concentration (%) |
|--------------------------------|-------------------|
| Matière Sèche (MS) | 75-80 |
| Matières Minérales (MM) | 3-5 |
| Matières Azotées Totales (MAT) | 5-10 |
| Cellulose Brute (CB) | 35-50 |
| Matières Grasses (MG) | 8-15 |

Parmi les applications des grignons d'olives on cite :

- Utilisation en tant que combustible.
- Utilisation dans le tonnage des peaux car ils sont riches en tanins et composés phénoliques.
- Utilisation dans l'alimentation animale pour compléter l'alimentation des ovins dans la période sèche (Sebban et al., 2004).

I.3.3. Tégument de chêne vert (*Quercus ilex*)

En Algérie, le chêne vert occupe une partie importante des forêts Algériennes (Koumiche., 2016). C'est un arbre de moyenne dimension, de 5 à 10 mètres de haut avec une cime ovale (Sarir, 2016).

Les téguments sont riches en polyphénols qui sont des molécules végétales spécifiques, aux structures variées (Hagerman et al., 1998). Ils présentent plusieurs propriétés physiologiques, telles que antimicrobiennes, antithrombotiques, anticancérogènes, antioxydantes, cardioprotectrices anti-allergiques (Balasundram et al., 2006). Il même contient de flavonoïdes et de tanins.

Le tégument du chêne vert (*Q. ilex*) est une excellente source d'antioxydants naturels et de composés antibactériens, qui peuvent être utilisés dans la conservation des denrées alimentaires et permettent de limiter les risques dégénératifs de maladies liées au stress oxydatif et aux bactéries pathogènes (Settia et al., 2020).

I.4. Valorisation des sous-produits agro-alimentaires

Selon la directive de la Communauté Economique Européenne 75/442 (CEE) la valorisation est définie comme : « Le ramassage, le tri, le transport, le traitement des déchets, ainsi que leur stockage et leur dépôt sur ou dans le sol ; les opérations de transformation nécessaires à leur réutilisation, à leur récupération ou à leur recyclage » (Bicocchi et Bonneaud, 2007).

I.4.1. Types de la valorisation

Les sous-produits générés par les industries agroalimentaires peuvent être valorisés par différentes manières (Figure 04) dont l'objectif principal est de les rendre utilisables à une fin particulière.

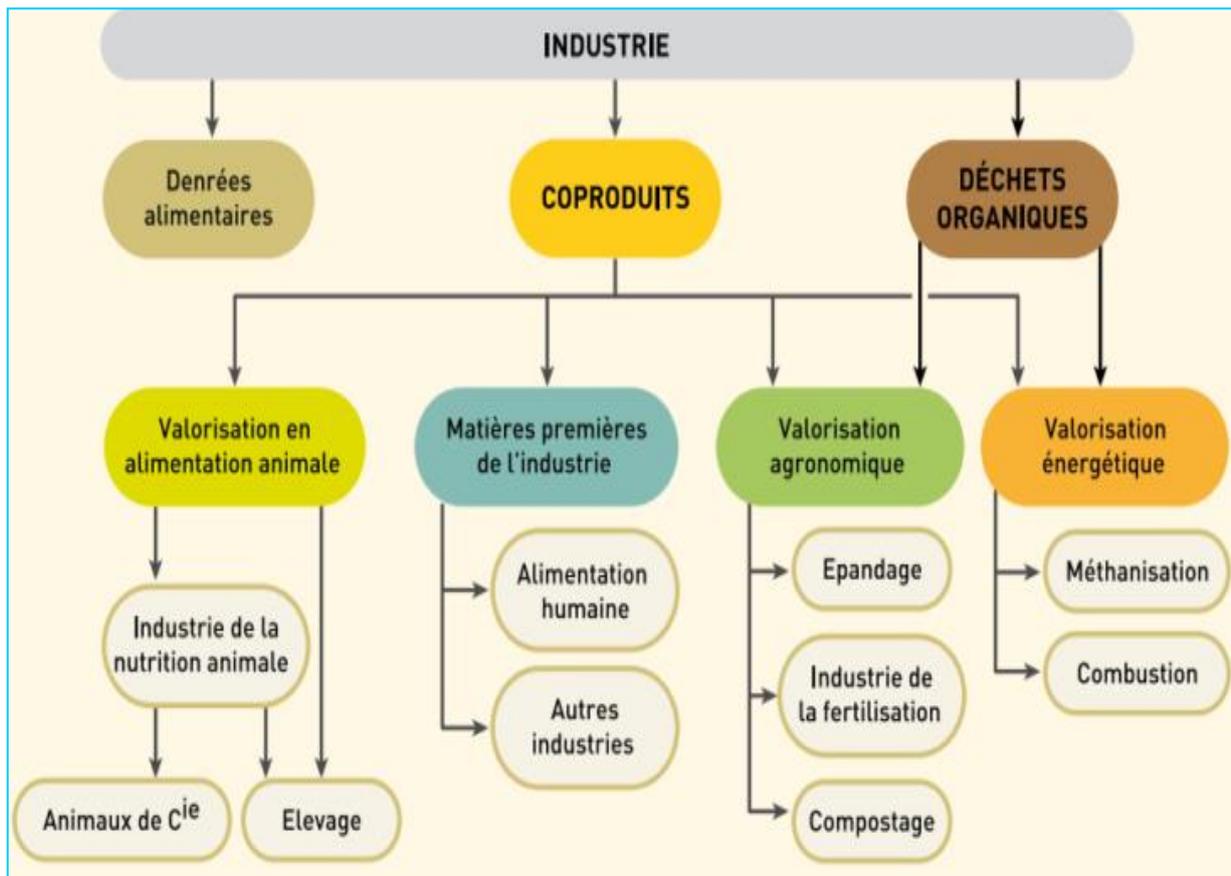


Figure 04. Schéma récapitulatif des types de la valorisation (Réséda et ADEME, 2008).

a. Valorisation énergétique

La valorisation énergétique a pour objectif de produire l'énergie soit par la méthanisation ou par la combustion.

a.1. La méthanisation ou digestion anaérobie : c'est une technique basée sur la dégradation de la matière organique, la réaction se fait en milieu anaérobie (Figure 05). Cette dégradation va produire le biogaz qui est un mélange de méthane CH_4 , environ 50 à 70%, de 20 à 50% de gaz carbonique CO_2 et de quelques gaz traces NH_3 , N_2 , H_2S il peut être valorisé par différentes façons (Guillaume, 2015):

- Brûler directement dans des chaudières pour produire de la chaleur,
- Bruler dans un moteur de cogénération pour produire l'électricité et de la chaleur.

Le Digestat est défini comme un produit partiellement stabilisé, humide, il est riche en matière organique (Guillaume, 2015).

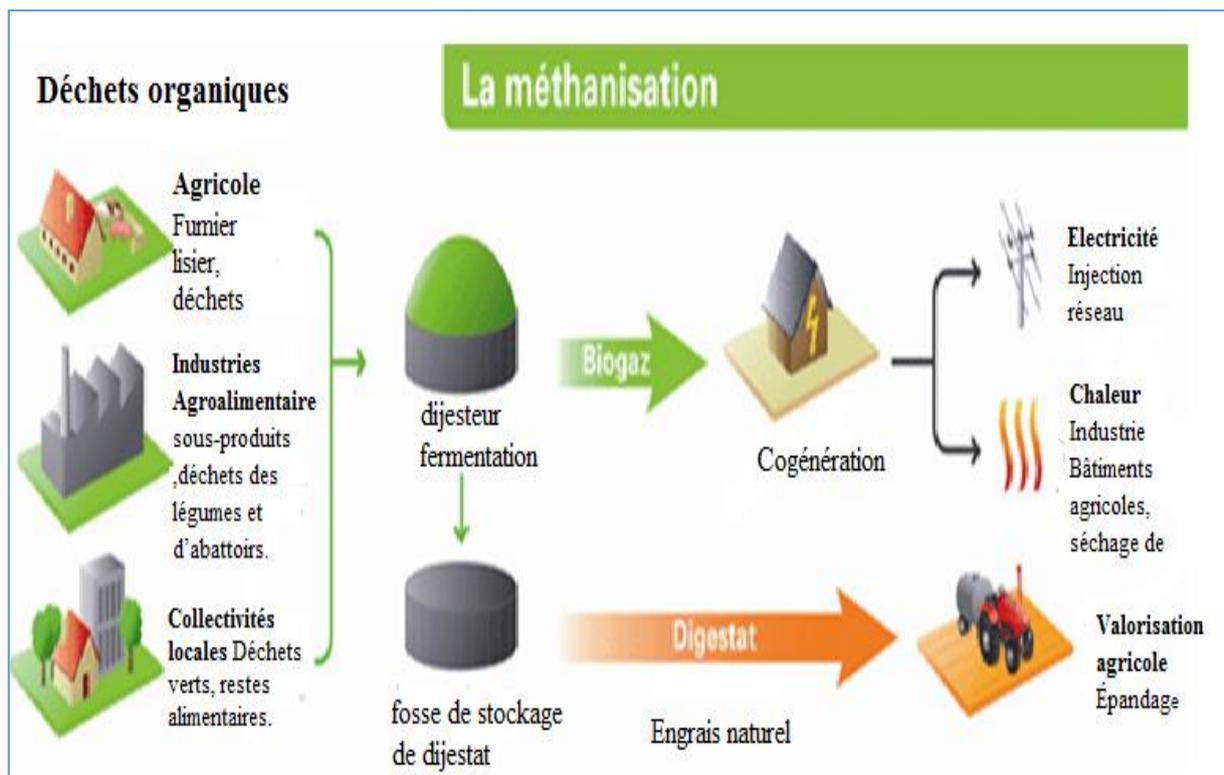


Figure 05. Schéma représentatif des étapes de la méthanisation (l'Aube et Holding, 2012).

La méthanisation a des avantages et des inconvénients qui sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 03 Avantages et inconvénients de la méthanisation (Guillaume, 2015).

| Les avantages | Les inconvénients |
|--|--|
| <p>-Intérêt spécifique de la méthanisation c'est la double valorisation de la matière organique</p> <p>-La méthanisation va diminuer la masse des déchets organique (sous-produits) qui va être traité par d'autres filières</p> <p>-Les émissions des gaz seront diminuées avec le changement d'usage d'énergies fossiles ou d'engrais chimiques.</p> | <p>-Le biogaz est un gaz dangereux explosif, toxique et corrosif. Pour l'utiliser, il faut donc prendre le minimum de précautions.</p> |

a.2. La combustion : c'est une technique de traitement thermique des sous-produits. C'est de brûler les ordures dans des fours spécifiques. Cette réaction va dégagée une chaleur qui va être récupérée, au début elle est sous forme de vapeur après ça elle est introduite dans un turbo-alternateur produisant de l'électricité (Ifremer, 2010).

b. La valorisation en alimentation animale

Cette valorisation est dans le but de fournir l'alimentation des animaux (des protéines, énergie, des acides gras), par l'utilisation des différents paramètres (technologie de l'usine, environnement,...etc.), il faut que les sous-produits utilisés présentent une valeur nutritive intéressante, et respectent les termes d'hygiène et de qualité et n'ont pas être contaminés (Fevrier et al., 2009).

c. La valorisation agronomique

Plusieurs procédés sont appliqués dans la valorisation des sous-produits alimentaires à savoir :

c.1. Fabrication d'engrais ou d'amendements organiques : l'engrais est un produit qui se présente sous forme solide ou liquide il va fournir les éléments nutritifs aux plantes et les amendements, dans le but d'amélioration des propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols (Ademe, 2017).

c.2. L'épandage : c'est une technique agricole consistant à épandre divers produits sur des zones agricole, les matières épandues sont des engrais ou amendements minéraux, matières organiques.....etc. L'épandage a des nombreux avantages tels que la permission d'un retour direct des déchets organiques au sol, mais sa prendre de temps car les sous-produits et les déchets nécessitent un stockage en attendant les conditions climatiques et/ou réglementaires favorables (Muller, 2016).

c.3. Le compostage : le compostage est le processus de transformation biologique de matières organiques (déchets végétaux, restes des repas, déjections,.....etc.) en conditions d'aération (Figure 06) permettant de produire un compost utilisable en agriculture en tant qu'amendement organique (Boutin et al., 2010).

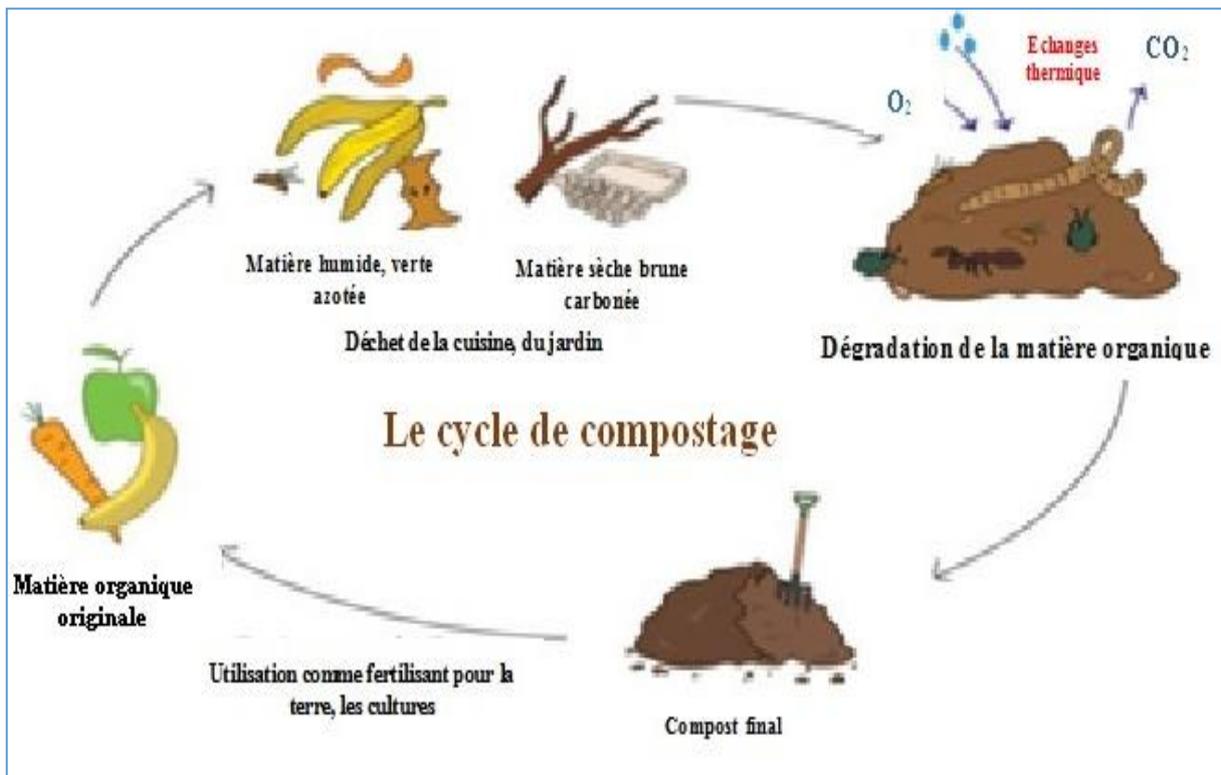


Figure 06. Schéma récapitulatif le cycle de compostage (Boutin et al., 2010).

d. La valorisation en matière première

Ce type s'intéresse à la valorisation des sous-produits en alimentation humaine, par exemple la gélatine bovine (Réséda, 2017). Il existe d'autres voies de valorisation pour les sous-produits des industries agroalimentaires tels que :

d.1. Fabrication des biocarburants : en utilisant les réserves de plantes cultivés, ressources sucrières, ou même les matières grasse des animaux pour la fabrication de biodiesel ([Gurtler, 2008](#)).

d.2.L'extraction des molécules d'intérêts : cette valorisation n'est pas vraiment utilisé mais elle a une valeur importante, tel que l'utilisation des sous-produits qui sont issue de la filière de la pêche-aquaculture pour faire l'extraction d'acide hyaluronique pour la formulation des produits cosmétiques ou pharmaceutiques ([Ifremer, 2010](#)).

Chapitre II

II. Généralités sur les biosurfactants

II.1. Définition des surfactants et biosurfactants

Les surfactants sont des molécules bipolaires (partie hydrophile et hydrophobe) (Markets et markets, 2016). Ils sont synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants). La classification des tensioactifs se fait selon la nature de leurs têtes polaire (Shekhar et al., 2015). Les surfactants sont parfois dénommés selon la fonction : détergent, agent dispersant, agent de solubilisation, agent mouillant, agent émulsifiant et agent moussants (Santos et al., 2016).

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles produites par une variété de micro-organismes, notamment des bactéries, des levures et des champignons flambants ils diminuent l'activité de la surface et ont diverses polarités comme fluide à air et fluide à fluide ils possèdent la caractéristique d'être soluble dans les solvants polaires et apolaires (Dessai et Banat, 1997).

Les biosurfactants peuvent former des agrégats et des micelles (Figure 07). C'est un arrangement stable des molécules amphiphiles sous la forme d'une sphère possédant une partie extérieur hydrophile et une partie intérieur hydrophobe. (Pacwa-Plokiniczak et al., 2011). La partie hydrophile peut inclure un acide carboxylique ou un alcool, acide aminé, peptide cationique ou anionique, ou un saccharide. Par ailleurs, la partie hydrophobe est constitué de chaine d'hydrocarbure ou d'acides gras saturés ou insaturés (Dessai et Banat ,2011 ; Khopade et al ., 2012).

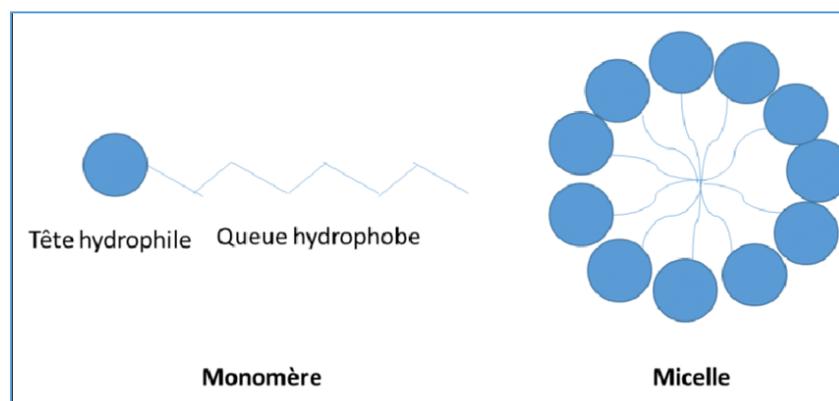


Figure 07 : Structure d'un biosurfactants et formation d'une micelle (Zenati,2018).

II.2. Origine des biosurfactants

Les biosurfactants sont synthétisés naturellement soit par des animaux, des plantes (la saponine) et principalement par les microorganismes généralement les levures, les champignons et les bactéries (Michel et al., 2021), qui se développent soit en aérobie ou en anaérobie, elles utilisent plusieurs sources de carbones.

II.3. Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont classés par leur composition chimique et leur masse moléculaire (Desai et Banat, 1997).

II.3.1. Selon la composition chimique

On distingue 5 grandes classes : Les glycolipides, les lipopeptides (lipoprotéines), les phospholipides, les lipides neutres, les biosurfactants polymériques et les biosurfactants particuliers (Healy et al., 1996).

II.3.1.1. Les glycolipides

C'est la classes la plus connue, ils sont composés d'hydrate de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques et d'acides hydrox aliphatiques (Santos et al., 2016). Parmi eux on distingue : les glucose-lipides, les pentasaccharide-lipide et les mélanges variés les rhamnose-lipides (rhamnolipides), les tréhalose-lipides et les sophorolipides. Ces 3 derniers sont les glycolipides les plus étudiés (Chrzanowski et al., 2012).

a. Les rhamnolipides : sont des molécules (Figure 08) produites principalement par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. Leur composition est une combinaison di-rhamnolipide de L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl-hydroxydécanoyle-hydroxydécanoate (Rha-Rha-C₁₀-C₁₀) et L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl-hydroxydécanoate (Rha-Rha-C₁₀) (Abdel-Mawgoud et al., 2010).

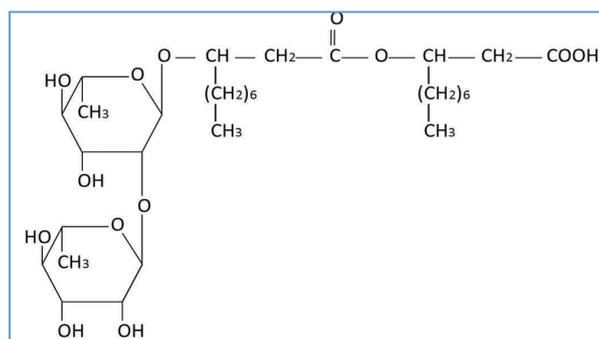


Figure 08 : Structure chimique de rhamnolipide (Roy, 2014).

b. Les sophorolipides : sont des glycolipides (Figure 09) produites principalement par certaines levures du genre *Candida*(Cortés-Sanchez et al., 2013), *Candidabombicola*, *Candida batistae*, *Candida floricola*...etc(Oliveira et al., 2015). Ils sont constitués d'un dimère d'hydrate de carbone sophorose (2-O-β-glucopyranosyl-β-D-glycopyranose) lié à un acide gras hydroxylé par une liaison glycosidique (Callaghan et al., 2016).

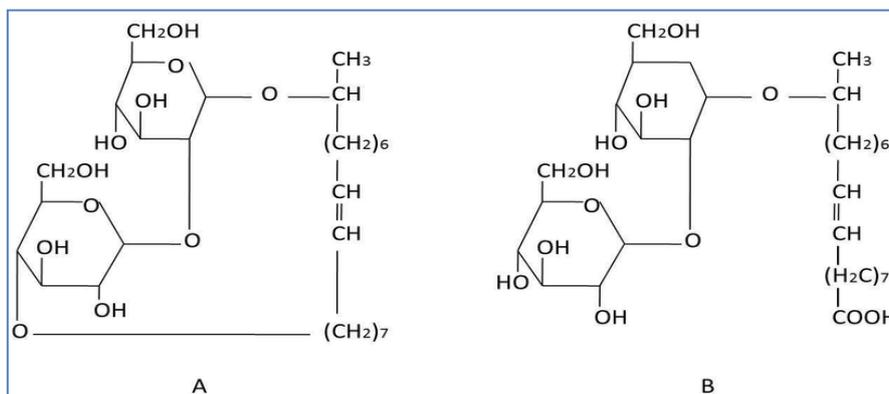


Figure 09 : Structure des formes sophorolipidiques : *Lactone* (A) et *Acide* (B)(Kapadia-Sanket et Yagnik, 2013).

c. Les tréhalose-lipides : sont des produits (Figure 10) de l'espèce de *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* ...etc. (Vijayakumar et Saravanan, 2015). Ils sont composés d'un disaccharide de tréhalose lié au niveau de C-6 et C-6' à une chaîne d'acide gras par une liaison ester (Asselineau, 1978 ; Cooper et al., 1989).

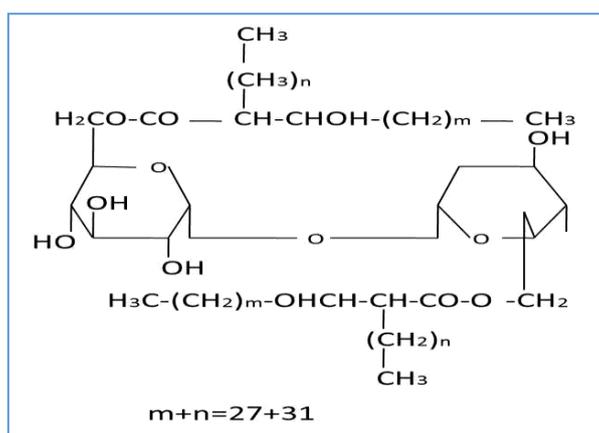


Figure 10 : Structure chimique du tréhalolipide (Kapadia-Sanket et Yagnik, 2013).

II.3.1.2. Les lipopeptides

Ils sont des molécules composés d'un cycle peptidique lié à une chaîne d'acide gras (Figure 11), les lipopeptides peuvent être linéaires ou bien cycliques (Ongena et Jacques,

2008), ces derniers sont synthétisés par plusieurs espèces bactériennes de Gram positif comme *Bacillus*, *Lactobacillus*...etc. et d'autres espèces à Gram négatif comme *Pseudomonas* (Henkel et al., 2017). Les classes les plus étudiées sont les surfactines, les iturines et les fengycines (França et al., 2015).

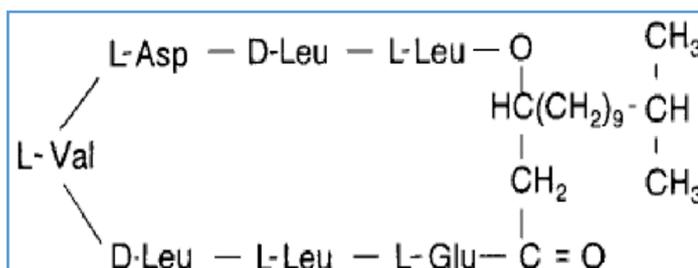


Figure 11 : Structure chimique d'une molécule de lipopeptide (Yamane, 1987).

II.3.1.3. Les Phospholipides

Les phospholipides sont des lipides amphiphiles (Figure 12) constituées d'une tête polaire et deux queues hydrophiles (McClemets et Gumus, 2016). Ils sont classés selon deux groupes glycérophospholipides et glycérophospholipides. La production des phospholipides a été également détectée dans quelques espèces d'*Aspergillus* et *Thiobacillus thiooxidans* (Kappeli et Finnerty, 1979).

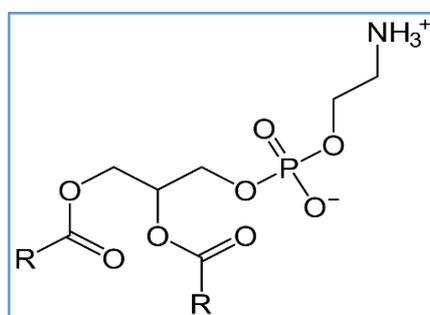


Figure 12 : Structure chimique d'un phosphatidyl-éthanol-amine (Wellner et al., 2013)

II.3.1.4. Les biosurfactants polymériques

Ce sont généralement des polymères d'hétéro-saccharides contenant à la fois des polysaccharides et des protéines. Ce sont des biopolymères de poids moléculaire élevés. Les classes les plus étudiées sont l'émulsane (Figure 13), lipomanane, l'alsane et lipolsane (Sentos et al., 2016).

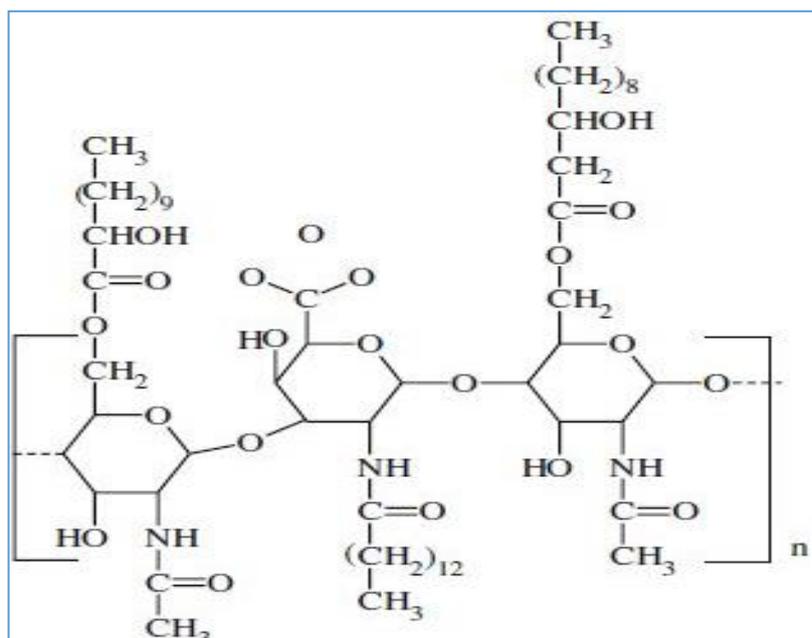


Figure 13 : Structure chimique d'un emulsan produit par divers espèces d'*Acinetobacter* (Jacque, 2011).

II.3.1.5. Les biosurfactants particulier

Quelques exemples des biosurfactants particuliers sont les vésicules membranaires extracellulaires des cellules microbiennes. Ils améliorent la biodisponibilité des hydrocarbures en formant des microémulsions (Banat et al., 2000).

Il a été rapporté que des vésicules membranaires extracellulaires d'un diamètre de 20 à 50 nm et d'une densité spécifique de 1.158 g/cm² s'agrègent dans les cellules de la bactérie d'*Actinobacter sp* (Figure 14). Les vésicules ainsi purifiées sont composées de protéines, de phospholipides et de lipopolysaccharides (Banat et al., 2000 ; Mukherjee et Das, 2010).

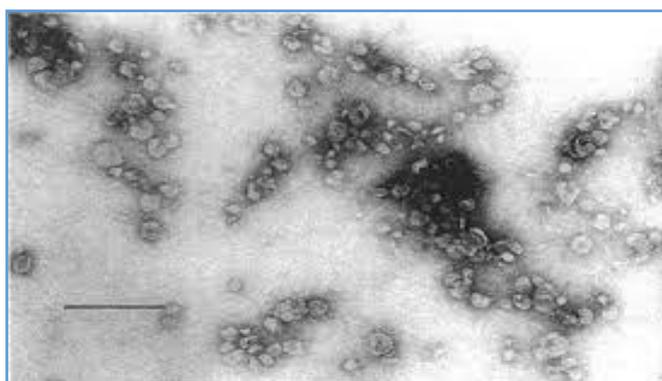


Figure 14 : Vésicules membranaires produits par *Actinobacter sp* observées par microscopie électronique, en utilisant la technique de coloration négative (Finnerty et Kappeli, 1979).

II.3.2. Selon le poids moléculaire

Les biosurfactants sont classés en deux classes selon leurs poids moléculaire :

II.3.2.1. Faible poids moléculaire

Ils contiennent les glycolipides, les phospholipides et les lipopeptides, ces molécules communément appelés biosurfactants réduisent efficacement les tensions de surface et interfaciale (Jacques, 2011).

II.3.2.2. Haut poids moléculaire

Il contient les groupes des protéines et des polysaccharides, sont définis comme des bioémulsifiants qui sont utilisé dans la stabilisation de complexe huiles-eau (Healy et al., 1996).

II.4. Avantages des biosurfactants

Les biosurfactants présentent plusieurs avantages. Les principaux avantages des surfactants dérivés des microorganismes sont :

II.4.1. Faible toxicité

Les biosurfactants sont généralement des produits non ou faiblement toxiques, c'est pour cet avantage, les biosurfactants sont utilisés dans les domaines pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaire (Vijayakumar et Saravanan, 2015). Egalement Luna et ces collaborateur ont montrés l'absence de toxicité des biosurfactants produite par *Candida sphaerica* (Luna et al., 2013).

II.4.2. Disponibilité de matières premières

La production des biosurfactants est économique car son processus est lié à la valorisation des sous-produits et déchets telles que le pétrole colza, eaux usées, les effluents des pommes de terre, déchets de raffinage du pétrole, eaux usées, lait caillé et déchets de distillerie, huile de tournesol,etc.(Muthusamy et al., 2008) .

II.4.3. Tolérance aux différents paramètres physico-chimiques

La majorité des biosurfactants sont résistants aux facteurs environnementaux extrêmes comme la température, le pH et à la salinité (Banat et al., 2000).

Par exemple, le lipopeptide de *Bacillus licheniformis* est stable jusqu'à 140 heures à des températures d'environ 75°C, et de pH 5 à 12. Le biosurfactant tolère également des concentrations de sel jusqu'à 10%, tandis que 2% de NaCl est suffisant pour désactiver les tensioactifs conventionnels (Mohan et al., 2006).

II.4.4. Activité de surface et l'interface

La tension superficielle, c'est la force d'attraction entre les molécules liquides (Pacwa-Plociniczak et al., 2011). La surface c'est la limite entre un liquide et l'air tel que eau /air et l'interface est considérée comme la limite entre deux liquides huile/ eau (Banat et al., 2010).

Les biosurfactants ont une excellente activité de surface (Figure 15), ils aident à réduire la tension superficielle et la tension entre les faces et ils fonctionnent mieux que les surfactants chimiques en raison de leur faible concentration micellaire (CMC) (Desai et Banat, 1997). La CMC est la concentration d'un agent de surface (biosurfactant) au-dessus duquel certaines molécules sont dispersées dans agrégats sous forme de micelles en solution aqueuse (Poré, 1992).

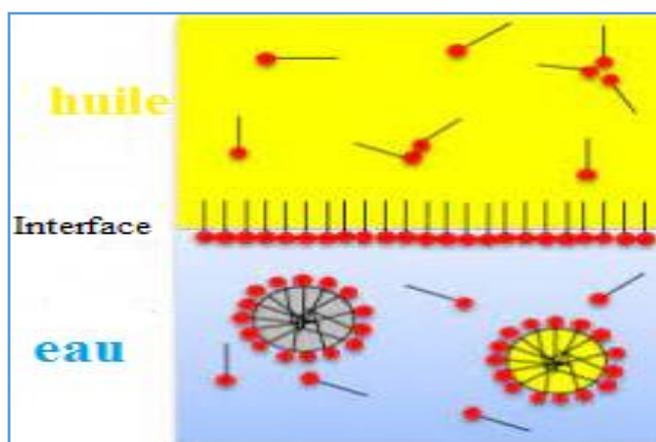


Figure 15 : Partage des tensioactifs entre un milieu gras et un milieu aqueux (Hutin, 2019).

II.4.5. Biodégradabilité

La biodégradabilité est une question importante au problème lié à la pollution environnementale, mais les biosurfactants sont des produits qui ont cette capacité, sont facilement dégradés par des bactéries, des champignons ou d'autres organismes simples sans créer des problèmes pour l'environnement (Mohan et al., 2006).

II.5. Applications des biosurfactants

Les biosurfactants ont l'avantage d'introduire une variété de matériaux et de produits chimiques qui peuvent présenter un intérêt particulier pour des besoins spécifiques. Par conséquent, ils ont une large gamme d'utilisation dans différents domaines (Tableau 05) (Rodrigue et al., 2006 ; Santos et al., 2016).

Tableau 04 : Différents domaines d'application des biosurfactants

| Domaine | Application | Rôle des biosurfactants | Références |
|--------------------------|--------------------------------------|--|---------------------------------|
| Pétrole | Récupération assistée du pétrole | Améliorer l'huile de drainage dans les puits. | Pacwa-plociniczak et al., 2011. |
| | Désémulsification | Solubilisation des émulsions, dispersion des huiles. | |
| Env. | Remédiation de sol | Rinçage du sol. Inhibiteur de corrosion. | Silva et al., 2014. |
| Biologie médicale | Pharmaceutiques et Thérapeutiques | Antifongique, antiviraux, antimicrobien, utilisé pour la préparation des vaccins. | Lawniczak et al., 2014. |
| Agriculture | Biocontrôle des engrais | Élimine et augmente la biodisponibilité des nutriments dans les micro-organismes bénéfiques liés aux plantes | Sachdv et Cameotra, 2013. |
| Alimentaire | Emulsifiassions et désémulsification | Solubilisation de l'huile aromatique Ils jouent le rôle de mouillage et détergent | Campos et al., 2013 |
| Cosmétiques | Produits de beauté | gents moussants, mouillants et nettoyeurs | Vijakumar et Saravanan, 2015 |
| Nettoyage | Détergeant à lessive | Désinfectant pour la lessive | Banat et al., 2010. |

Env. : Environnements

Partie II:
Procédures expérimentales



Chapitre III

Le gaspillage des produits agroalimentaire a résulté l'apparition importante des sous-produits agroalimentaires polluantes pour l'environnement ce qui a créer l'idée de leur utilisation pour un effet plus bénéfique, d'une autre manière : la valorisation de ces produits pour la production des biosurfactants par exemple.

La présente étude est réalisée au niveau de laboratoire de microbiologie de la faculté d'Akli Mohand Oulhadj de Bouira. Dans cette recherche, un milieu synthétique a été préparé comme milieu de référence, pour le but de faire la comparaison avec d'autres milieux qui sont issus des poudres des sous-produits agroalimentaires qui coutent moins chères pour l'augmentation de rendement des biosurfactants avec un coût de production plus bas.

III.1. Matériel

III.1.1. Matériel biologique

Deux souches bactériennes, codées S1 et S2, utilisées dans cette étude, isolées et purifiés par notre équipe de recherche de laboratoire de microbiologie de Laboratoire de Biomathématiques, Biophysique, Biochimie et Scientométrie (L3BS), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université de Bejaia.

III.1.2. Matériel non biologique

Les équipements, les appareillages et la verrerie utilisés sont présenté dans l'annexe N°01, tandis que les milieux de cultures utilisés dans notre travail sont mentionnés dans l'annexe N°02.

III.2. Méthodes

III.2.1. Revivification des souches

La revivification des souches bactériennes, S1 et S2, a été réalisée dans des tubes à essai qui contiennent le Bouillon Nutritif (BN), sa préparation est présentée dans l'annexe N°02. Les souches bactériennes ont été conservés dans des tubes de Gélose Nutritive (GN) incliné (Annexe N°02), la revivification des souches a été faite à l'aide d'une pipette pasteur par un prélèvement de quelques colonies bactériennes suivi par une inoculation des tubes qui contiennent 5 ml de BN, les tubes ont été incubé à 35°C/ 24 h ([Ocampo et al., 2017](#))

III.2.2. Vérification de la pureté des souches

La vérification de la pureté des souches S1 et S2 a été faite dans des boîtes de pétrie qui contiennent de la gélose nutritive. Cette étape a été réalisée à base d'un ensemencement liquide-solide des souches bactériennes qui sont déjà revivifiées dans les tubes de BN dans les boîtes de pétrie qui contiennent la GN (Figure 16) puis incubés pendant à 35 °C/24 h (Thomas *et al*, 1970).

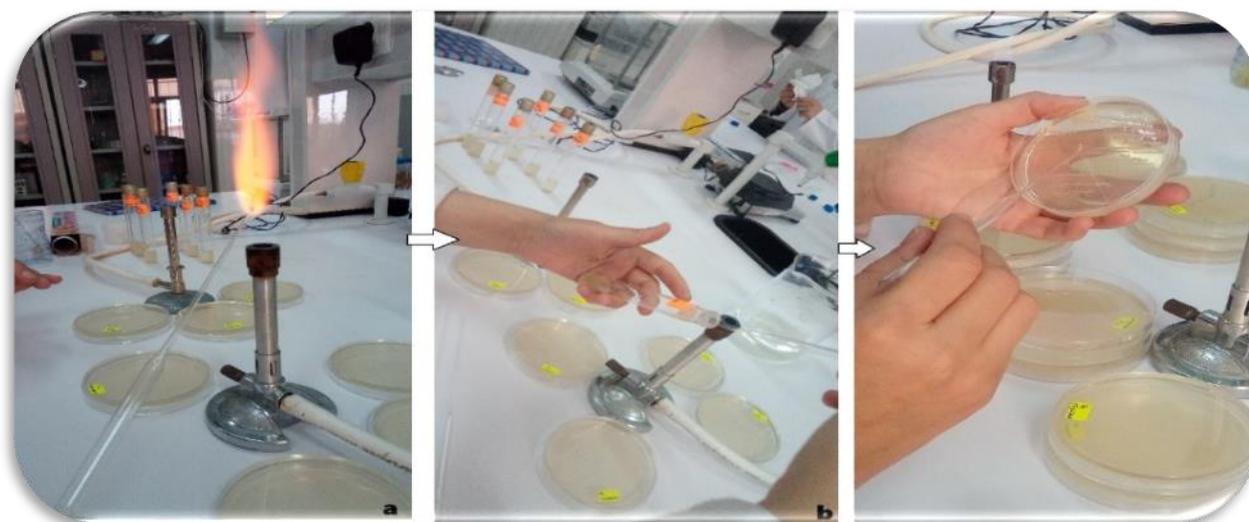


Figure 16: Vérification de la pureté des souches (Photo Originale).

III.2.3. Etude des caractéristiques morphologiques et biochimiques des souches

III.2.3.1. Aspect macroscopique

C'est l'étape initial qui introduit à la vérification des bactéries, elle est basée sur la description des colonies des souches S1 et S2 qui sont obtenues sur le milieu solide. Cette étape est basée sur les caractères morphologiques des colonies qui sont observés à l'œil nu : la forme des colonies, la taille des colonies, la chromogène ou la couleur des pigments, l'Opacité, l'élévation, l'aspect de surface, la consistance, l'aspect de contour (Johnson *et al*., 1980).

III.2.3.2. Etude microscopique

Cette étude est basée sur l'observation des bactéries pour savoir leur forme, mobilité et leur mode d'association.

a. Coloration de Gram

***Préparation du frottis :** La préparation des frottis a été réalisée à base d'un repiquage des souches S1 et S2 jeunes (24-48h) cultivées sur la gélose nutritive, quelques colonies ont été prélevées et déposées sur la lame contenant des gouttes d'eau distillée (Figure 15), puis étalées d'une façon à avoir une couche fine et homogène. Par la suite la lame a été passée sur une flamme bleue de bec bunsen pour la fixation de frottis par séchage (Canler, 2005)

***Étapes de coloration de Gram :** L'ajout de quelques gouttes de violet de gentiane au frottis préparé préalablement (Figure 17) puis laissé agir pendant 01 min, puis rinçage à l'eau distillée. Le mordantage a été effectué par l'immersion de la lame dans le Lugol, puis laisser agir 01 min, en élimine l'excès de Lugol et rinçage à l'eau distillée. La décoloration a été faite en recouvrant le frottis par l'alcool et laisser agir 30 secondes puis rinçage avec l'eau distillée. L'étape de la recoloration par la Fushine a été réalisée par l'ajout de quelques gouttes de la Fushine au frottis puis laissé agir 01 min rincer la lame avec l'eau distillée, séchage à la flamme bleue de bec bunsen (Baldent, 1997). La détermination de type de Gram des souches étudiées a été faite par l'observation des frottis avec le microscope optique (X100) avec l'ajout de 1 à 2 gouttes de l'huile à immersion (Dussault, 1955).

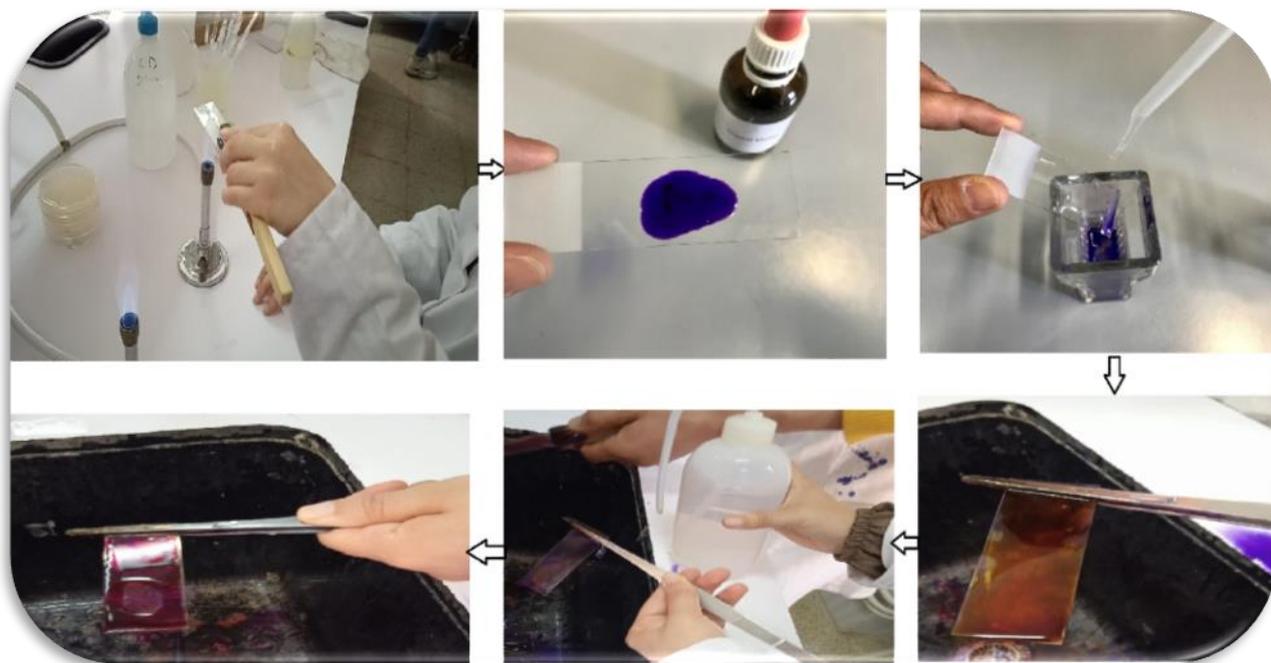


Figure 17 : Etapes de la coloration du Gram (Photo Originale).

III.2.3.3. Tests biochimiques

Les tests biochimiques qui sont fait pour les souches S1 et S2 productrices de biosurfactants sont comme suit :

a. Test catalase

La catalase est une enzyme présente chez les bactéries aérobies strictes et les bactéries anaérobies facultatives la catalase accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et oxygène $Inoculum + H_2O_2 = H_2O + 1/2 O_2$ (Vesina et Lacroix, 2000).

- Une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été déposée sur des lames de verre propres (Figure 18).
- Mis en contact avec des colonies isolées sur milieu GN des souches S1 et S2.
- Collecté directement avec une pipette Pasteur bouclée.
- La présence de la catalase se traduit par l'apparition des bulles (Kannika, 2003).

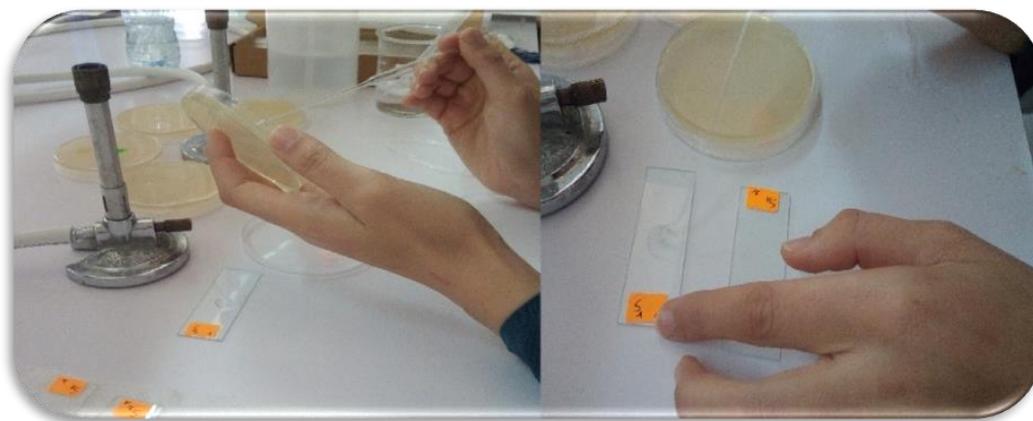


Figure 18 : Enchaînement des étapes de test catalase (Photo Originale).

b. Production de sulfure d'hydrogène l' H_2S

- Inoculation de la souche S1 et la souche S2 dans des tubes gélosé du milieu TSI (Triple Sugar Iron), Annexe N° 02, par ponction centrale du culot, et en stries sur toute la surface de la pente.
- Les tubes ont été incubés à $37^{\circ}C$ pendant 24-48 h.
- La production de sulfure d'hydrogène se traduit par une coloration brunâtre qui est apparue le long de la pique (Kannika, 2003).

c. Formation de l'indole

La formation de l'indole se fait par l'hydrolyse le tryptophane pour donner une molécule d'indole. Ce test a été réalisé par l'ensemencement d'un volume d'inoculum dans un milieu de culture urée indole à base de tryptone (Annexe N° 02) puis incubée à 37°C pendant 24 -48 h ([Kannika, 2003](#)).

d. Test de Voges-Proskauer (VP)

Le test est réalisé sur le milieu urée tryptophane comme suit :

- Ensemencement d'une suspension en milieu Urée-tryptophane d'un tube Clark et Lubs et Incuber 24 h à T optimale.
- Ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol (VP1 et VP2) avec un même volume de soude concentrée (ou de potasse),
- Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation et attendre quelques minutes à 1 heure.
- L'apparition de la couleur rouge indique que le résultat est positif ([Marchal et Bourdon, 1982](#)).

e. Test de Nitrate réductase

- Ensemencer les bouillons de nitrate avec une suspension bactérienne.
- Incuber les tubes à la température optimale 30°C ou 37°C pendant 24 heures.
- Après l'incubation, recherchez d'abord le gaz N₂ avant d'ajouter les réactifs.
- Ajouter 6 à 8 gouttes de réactif nitrite A et ajouter les 6 à 8 gouttes de réactif nitrite B.
- Observez la réaction (développement de la couleur) en une minute ou moins. Si aucune couleur ne se développe, ajouter de la poudre de zinc.
- Observer pendant au moins 3 minutes pour qu'une couleur rouge se développe après l'ajout de zinc ([Aryal, 2022](#)).

D'autres tests ont été réalisés tels que, le test NPG qui s'intéresse à la présence de l'action de l'enzyme de B-galactosidase utilisant le substrat synthétique (l'ortho-nitro-phényl-galactoside= ONPG), incolore et la couleur jaune indique la présence de l'enzyme. Le test ADH, LDC, ODC qui cherche la présence des enzymes ADH, LDC et ODC catalysent

respectivement la décarboxylation de l'arginine, de la lysine et de l'Orithine présent dans le milieu et la couleur violette indique la présence de ces enzymes (Debabza, 2014).

L'aptitude des souches S1 et S2 à utiliser le citrate de sodium comme seule source de carbone a été testée sur le milieu citrate de Simmons (Annexe N° 02). Un résultat positif est traduit par une coloration bleue (Simmons, 1926). Le test urée qui s'intéresse à la présence d'enzyme Uréase qui est exprimé avec un virage vers le rouge du milieu urée-indole (Annexe N° 02).

Le test TDA a été réalisé en milieu Urée-tryptophane (Annexe N° 02) en ajoutant le Fer III pour former un précipité marron (Debabza, 2014).

Le test de dégradation de gélatine a été réalisé par l'ajout d'un film photographique noir et blanc (composé de pellicule de gélatine reposant sur un film plastique transparent, la pellicule contient des particules d'argent noir) ou un disque de Köhn (constitué de gélatine) dans une suspension dense en eau stérile ou eau peptonée, la présence de gélatinase est exprimé par un pigment noir (De Vos et al., 2009).

Le milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate est un milieu de culture permet de mettre en évidence la mobilité par piqure central (trouble si le résultat est positif) et l'utilisation de mannitol qui s'exprime par le virage de couleur vers le jaune et la réduction de nitrate (Marchal et Bourdon, 1982).

La fermentation ou l'oxydation de sorbitol, inositol, rhamnose, saccharose, melibiose, amygdaline et arabinose a été faite sur des substrats correspondants, un résultat positif est exprimé par la couleur jaune (Debabza, 2014).

f. Test d'hémolyse

C'est la dégradation des globules rouges. La capacité des colonies bactériennes à induire une hémolyse lorsqu'elles sont cultivées sur gélose au sang est utilisée pour classer certains micro-organismes et on cite trois classe ; l'hémolyse Alpha lorsque la lyse est partielle et la couleur des colonies est sombre et verdâtre ; La bêta-hémolyse c'est hémolyse complète et la zone apparaît éclaircie (jaune) et transparente et enfin l'hémolyse Gamma Si un organisme n'induit pas d'hémolyse (Ray et al., 2004).

Les souches S1 et S2 étudiées ont été criblées, sous forme de stries, sur des boîtes de gélose Columbia contenant 5% (v/v) de sang frais (Figure 19) et incubées à température optimale pendant 24 à 48 h. L'activité hémolytique (hémolyse positive) a été détectée par la présence d'une zone claire autour d'une colonie (Hassanshahian, 2014, Yalaoui-Guellal et al., 2018).



Figure 19: Etapes de réalisation du test d'hémolyse (Photo Originale).

III.2.4. Préparation de poudres issues des sous-produits agroalimentaires

Dans cette étude, les poudres des épluchures des pommes de terre, téguments de chêne et grignons d'olives ont été valorisés pour la production des biosurfactants des souches étudiées S1 et S2.

Les poudres ont été préparés après un séchage à l'air libre à température chaude des épluchures des pommes de terre (Figure 20), grignons d'olives et les coques de chêne (les téguments) pendant quelques jours, par la suite ils sont broyés à l'aide d'un broyeur automatique puis tamisés dans un tamiseur de 0,2 μm de diamètre pour avoir une poudre fine.



Figure 20: Préparation de la poudre de pomme de terre (Photo Originale).

III.2.5. Préparation des milieux de production de biosurfactants

La production des biosurfactants a été faite par le processus de fermentation de type Batch, en utilisant le milieu minimum minéral (MSM), qui a été ajusté à pH $7,02 \pm 0,02$ (Annexe N° 02) (Yalaoui-Guellal et al., 2018).

Le milieu MSM a été complété par 2% de différentes sources de carbone (Figure 21) à savoir : le glucose (le milieu MG), la poudre des épluchures de pomme de terre (le milieu MEPT), la poudre des téguments (le milieu MT) et la poudre des grignons d'olives (le milieu MGO), par la suite les milieux ont été filtrés.

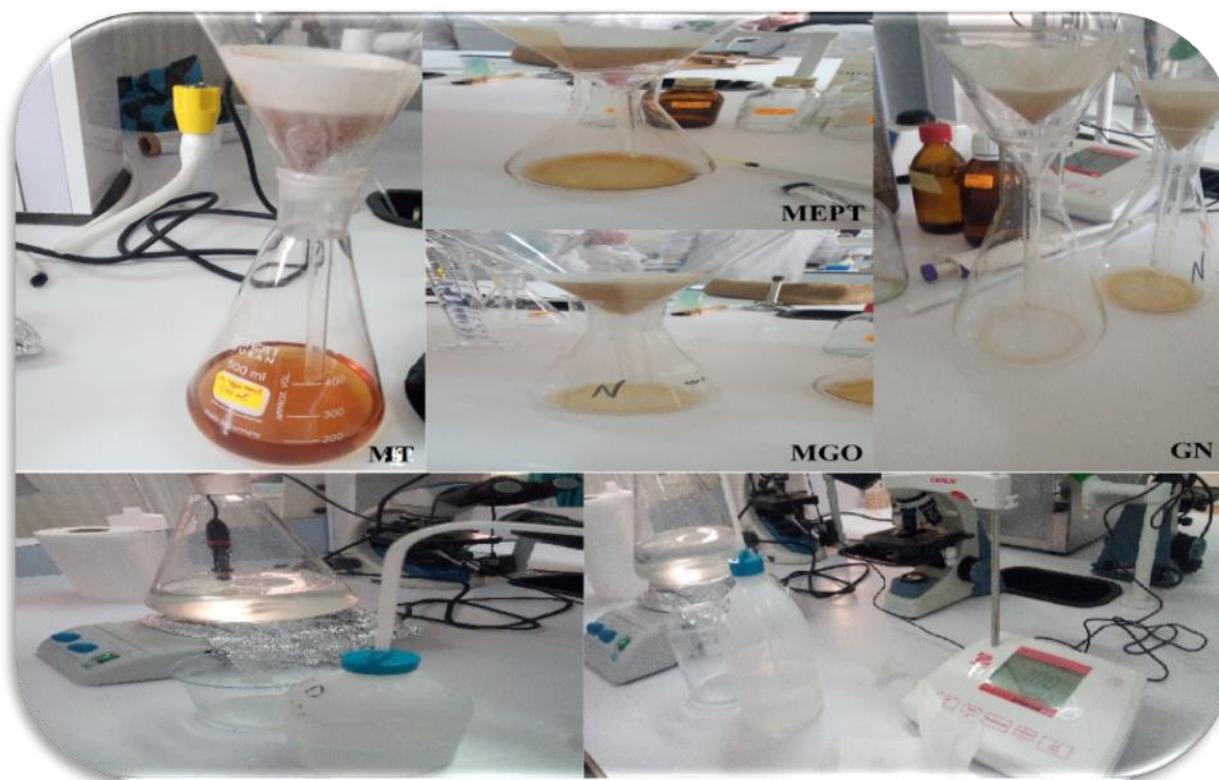


Figure 21: Préparation des milieux MSM avec différentes sources de carbone et mesure du pH de milieu MSM (Photo Originale).

III.2.6. Suivi de la production des biosurfactants

La fermentation a été réalisée dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de chaque milieu préparé, puis inoculé à 1% de l'inoculum de chaque bactérie (S1 et S2). Les expériences ont été réalisées en duplicata pour chaque milieu et chaque souche pour avoir des résultats statistiquement représentatif (Figure 22). Par la suite les erlenmeyers ont été incubé à 30°C sous agitation avec une vitesse de 150 tr/min pendant 7 jours (Yalaoui-Guellal et al., 2017 avec modification).



Figure 22 : Fermentation des milieux dans un fermenteur (Photo Originale).

Des échantillons de 10 ml ont été prélevés régulièrement chaque 24 h pour déterminer la biomasse bactérienne, analyse par la mesure de l'émulsification d'indice (EI24) et le déplacement de huile (DDH) du surnageant sans cellule, et les sucres réducteurs par la méthode DNS (Yañez-Ocampo et al., 2017).

III.2.6.1. Détermination de la croissance bactérienne

Les échantillons prélevés ont été centrifugés à 8000 g/20 minutes, pour permettre la précipitation de la biomasse bactérienne. Deux phases vont être apparaitre : un surnageant qui contient le biosurfactant et un culot qui représente biomasse bactérienne (Yalaoui-Guellal et al., 2017).

Après l'étape de centrifugation les culots ont été récupérer dans des boites de Pétri en verre, avec un poids connu (P_0), en respectant les milieux et les souches productrices, puis ils sont séchés à 80°C pendant 24 h. Par la suite les poids des boites séchés ont été déterminés (P_s), et la biomasse bactérienne sèche (BBS) a été déterminée par la formule suivante :

$$BBS = \frac{P_s - P_0}{V_p}$$

Où BBS est la biomasse bactérienne exprimée en mg/ml, P_s est le poids des boites après séchage, P_0 est le poids des boites vides et V_p est le volume de prélèvement (Yalaoui-Guellal et al., 2020).

III.2.6.2. Estimation de la production des biosurfactants

Les surnageants ont été récupérés dans des tubes à essai puis ils sont utilisés pour estimer la production de biosurfactants selon le milieu utilisé et la souche inoculée.

a. Indice d'émulsification (E24)

L'indice d'émulsification est un test qui sert à identifier le pouvoir d'émulsification vis-à-vis au pétrole. Il a été créé par Broderick et Conney puis il a été modifié par la suite par Francy et Bodour, le principe de ce test est basé sur la vérification de la capacité de la souche à émulsionner la phase hydrophobe, pétrole, dans la phase hydrophile, biosurfactants (Francy et al., 1991 ; Bodour et al., 2004).

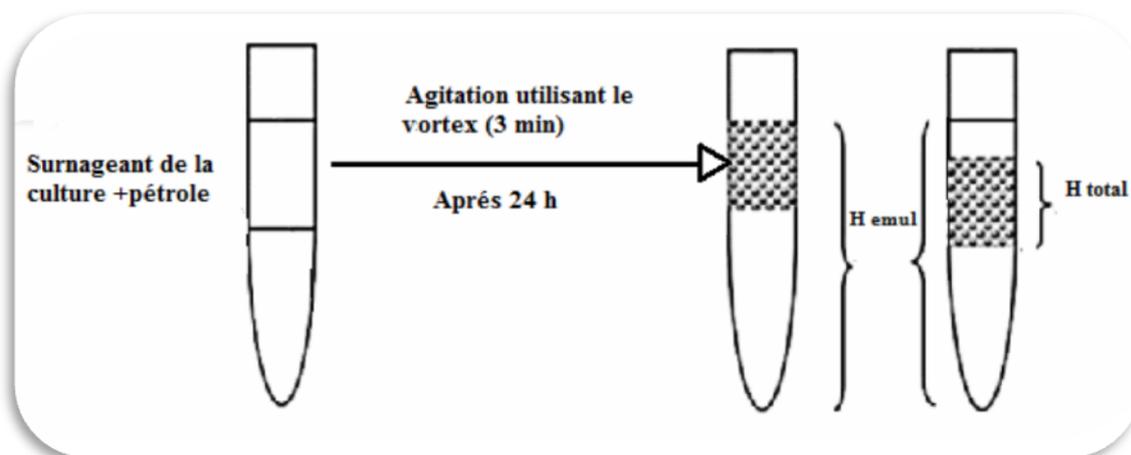


Figure 23 : Schéma représentatif de principe de test d'E24

L'activité d'émulsification a été faite en mélangeant 2 ml de chaque surnageant avec 2ml de pétrole dans des tubes à essai (Figure24). Les tubes sont ont été agités pendant 3 minutes, puis laissés au repos pendant 24 h à température ambiante.

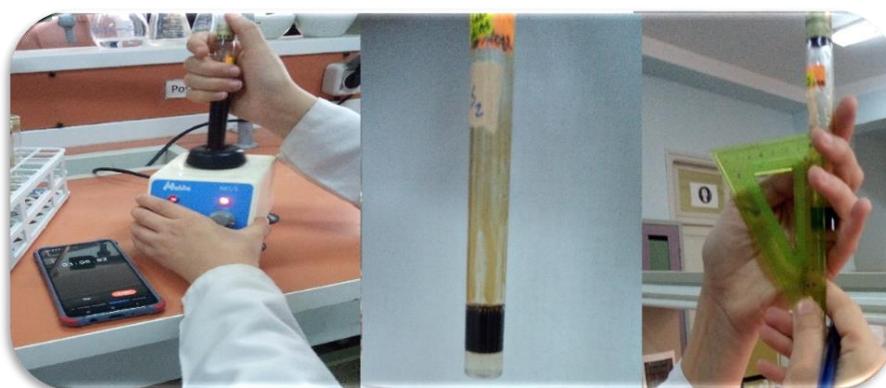


Figure 24 : Suivi d'étapes du test d'émulsification (E24) (Photo Originale).

Après 24h, L'activité d'émulsification est donnée par l'expression suivante:

$$E_{24} (\%) = \left(\frac{He (mm)}{Ht (mm)} \right) * 100$$

Lorsque E_{24} est l'indice d'émulsion après 24h, He est la hauteur de la couche d'émulsion, Ht est la hauteur totale du liquide (Emtiazi et al., 2009). Les émulsions formées par les isolats ont été comparées à celles formées par une solution aqueuse à 1% (p/v) d'un tensioactif synthétique (sodium Dodecyl Sulfate (SDS)) (Yalaoui-Guellal et al., 2018).

b. Test de déplacement d'huile (DDH)

C'est un test qui permet de détecter le taux de production des biosurfactants. Dans ce test 500 µl de pétrole sont ajoutés à 50 ml de l'eau distillé (Figure 25) pour former une mince couche d'huile (Liu et al., 2013). Après 100 µl de surnageant obtenu sont rajoutés doucement à la couche mince d'huile. S'il y a la présence de biosurfactants dans le surnageant, l'huile sera déplacé et un halo clair va être formé (Morikawa et al., 1993). Le diamètre d'halo a été mesuré pour déterminé la zone dégagé sur la surface de l'huile (pétrole).

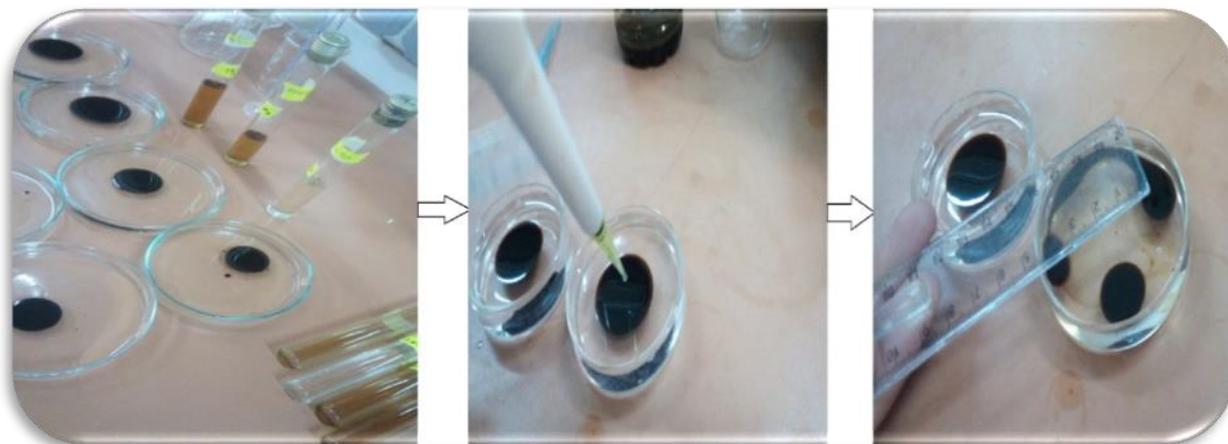


Figure 25:Test déplacement d'huile (Photo Originale).

III.2.6.3. Réduction des sucres par la méthode de DNS

Le dosage des sucres réducteurs par la méthode DNS (dinitrosalicylique) est en principe le dosage colorimétrique de glucose. La technologie est basée sur l'utilisation des propriétés réductrices des milieux chauds de glucose et des milieux alcalins pour réduire l'acide 3,5-dinitrosalicylique ou DNS (également connu sous le nom d'acide 2-hydroxy-3,5-dinitrobenzoïque) en tant qu'oxydant, le glucose étant un agent réducteur (Boulal et al., 2013).

Dans ce test 0,5 ml de chaque surnageant ont été mélangés avec 0,5 du réactif de DNS (Annexe N°03) dans des tubes à essai, puis incubés à 100°C / 5 min à l'abri de la lumière, l'eau distillée a été utilisé comme blanc .Après le refroidissement (10min), 4 ml de l'eau distillée ont été ajoutées pour chaque tube avec une agitation rapide et forte, puis lecture de l'absorbance à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible (Yañez-Ocampo et al., 2017).

III.2.7. Extraction et purification des biosurfactants

L'extraction des BS a été réalisée après la production à partir des surnageants de la centrifugation, en utilisant deux techniques : extraction par précipitation acide et extraction par solvant.

III.2.7.1. Extraction par précipitation

Le biosurfactants a été précipité à partir du surnageant de la culture en ajustant le pH à 2,0 avec l'HCl 6 N et en le gardant à 4°C pendant une nuit. Ensuite, le précipité a été recueilli par centrifugation à 8000tr pendant 20 min. Les biosurfactants bruts ont été lyophilisés et pesés pour la quantification et la mesure des propriétés tensioactives (Yalaoui-Guellal et al.,2018).

III.2.7.2. Extraction par solvant

L'extraction de BS par solvants décrite par, [Pereira et ses collaborateurs](#) a été utilisés pour extraire le BS à partir de surnageant récupéré après l'extraction par précipitation .Le mélange chloroforme/méthanol (2//1, v/v) a été ajouté au surnageant récupéré, après une forte agitation, les mélanges laissés au repos. Par la suite deux phases ont été formées, l'élimination du solvant se fait par séchage à 40 °C, le résidu résultant est un BS totale ([Pereira et al. 2013](#)).

Le produit final est lyophilisé, stocké à température ambiante. Le BS est pesé pour savoir son poids en grammes par litre, poids sec ([Yalaoui-Guellal et al., 2017](#)).

Chapitre IV

IV. Résultats et discussion

IV.1. Revivification et vérification la pureté des souches

Les souches S1 et S2 qui sont revivifiées et incubées dans le milieu BN ont montré des troubles qui sont présentés dans la (Figure 27) suivante



Figure 27 : Résultats de la vérification de la pureté des souches

Les troubles sont exprimés par la croissance des bactéries dans le milieu BN, ce qui exprime la vitalité des souches. Par la suite les souches S1 et S2 sont incubés sur la GN sont observées sous forme de colonies bien précises. Les colonies qui appartient à chaque boîte de pétri possèdent les mêmes caractères ce qui assure la pureté de chaque souche.

IV.2. Etude microbiologique des souches S1 et S2

IV.2.1. Aspect macroscopiques des souches

L'observation des souches étudiées a donné des résultats représentatifs de leurs caractéristiques qui sont détaillés dans le tableau ci-dessus

Tableau 05 : Les caractères macroscopiques des souches S1 et S2

| | Souche 1 | Souche 2 |
|----------------------------|---------------|---------------|
| Taille des colonies | Petite taille | Petite taille |
| Couleur | Rouge-orange | Jaune |
| Conteur | Lisse | Lisse |

IV.2.2. Aspect microscopique et biochimique

Les résultats de coloration de Gram et des tests biochimiques des deux souches sont présentés dans le tableau suivant

Tableau 06 : Résultats des différents tests biochimiques et de coloration de Gram des souches S1 et S2

| | Souche1 | Souche 2 |
|-----------------------|----------------|-----------------|
| Gram | + | + |
| ONPG | + | + |
| LDH | - | - |
| LDC | - | - |
| ODC | - | - |
| CIT | - | - |
| H₂S | - | - |
| URE | - | - |
| TDA | - | + |
| IND | - | - |
| VP | + | - |
| GEL | + | + |
| GLU | + | + |
| MAN | + | + |
| INO | + | - |
| SOR | - | - |
| RHA | + | + |
| SAC | + | + |
| MEL | + | + |
| AMY | + | + |
| ARA | + | + |
| Test catalase | + | - |

D'après les résultats donnés dans le tableau précédent on peut déduire que les deux souches sont de même type (Gram positif) et ils ont la même forme coccobacille, et d'autres

caractères biochimiques en commun tels que l'ONPG, LDH, LDC, CIT, H₂S, URE, IND, SOR qui sont marqués négatif.

Les deux souches ont la capacité de dégrader la gélatine (GEL), le glucose (GLU), le mannitol (MAN). Mais ils diffèrent dans d'autres caractères tels que TDA, VP, INO, catalase.

IV.2.3. Test d'hémolyse

L'activité hémolytique des souches étudiées (S1 et S2) a été testée par ensemencement de ces souches sur gélose au sang frais. Le résultat de ce test est représenté dans la (figure 28)

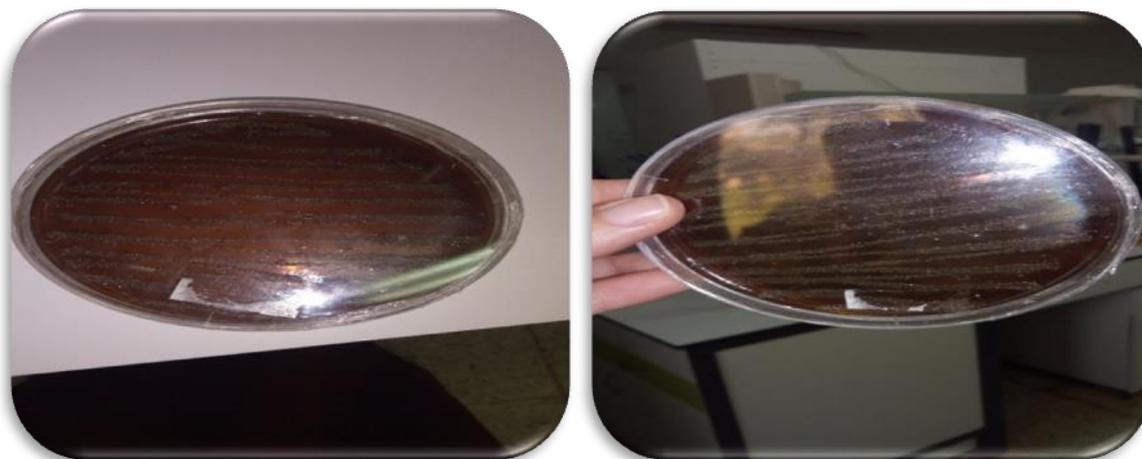


Figure 28 : Résultats de test d'hémolyse sur les deux souches

Après 24 h d'incubation, nous avons remarqué l'apparition des colonies abondantes qui traduit la bonne croissance bactérienne, mais aucune zone claire autour des colonies n'a été apparue, donc aucune hémolyse pour les deux souches.

D'après ce test les souches S1 et S2 n'ont pas l'activité hémolytique des hématies (hémolytique négative), donc leur biomolécules (Biosurfactants) libérées dans la gélose n'ont pas cette propriété. La nature non hémolytique de ces souches offre des opportunités d'applications dans plusieurs domaines tels que biomédicale ou pharmaceutique, cosmétique et dans le domaine agroalimentaire

IV.3. Suivi de la production de biosurfactants

IV.3.1. Détermination de la croissance bactérienne

Les résultats de la biomasse bactérienne obtenus pour chaque milieu des deux souches productrices sont apparait dans les courbes ci-dessus

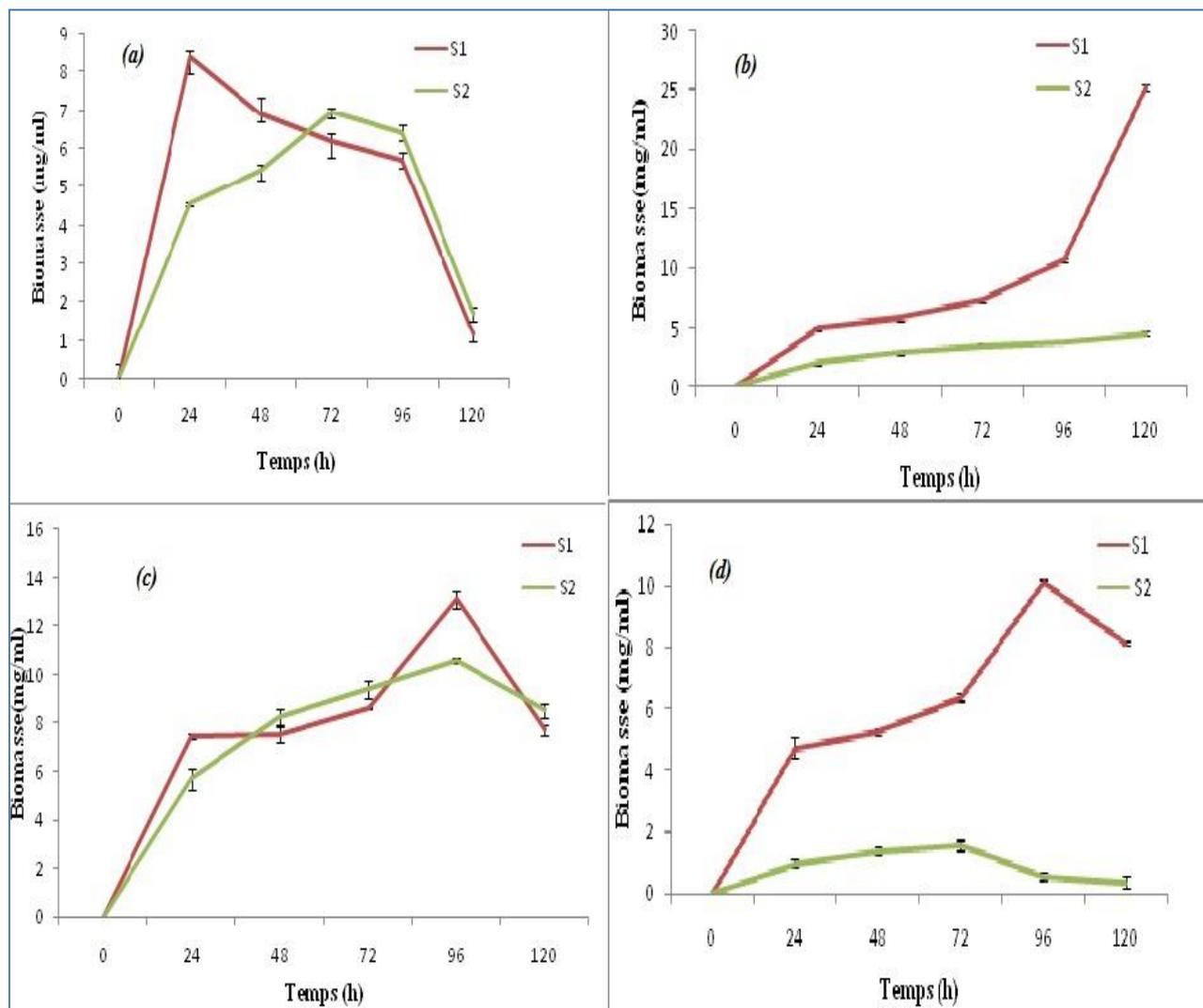


Figure 29 : Croissance bactérienne au cours de la fermentation

(a) : MGO (Milieu de grignons d'olives), (b) : MTC (Milieu de téguments de chêne),
 (c) : MEP (Milieu de pelures de pomme de terre) et (d) : MG (Milieu de glucose)

La source de carbone choisie 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 suivi de croissance bactérienne durant 7 jours sur différents milieux synthétiques (MGO, MTC, MEP) et un milieu de référence (MG) de deux souches productrices des biosurfactants S1 et S2.

Dans le milieu de référence où le glucose est la seule source de carbone (MG) la croissance bactérienne des souches S1 et S2 après 24 heures étaient respectivement à 4.74 ± 0.3 mg/ml et à 0.98 ± 0.1 mg/ml suivie par une augmentation de la biomasse bactérienne

après 48 heures avec une concentration de 5.25 ± 0.1 mg/ml pour la souche 1 et de 1.37 ± 0.1 mg/ml pour la souche 2.

La croissance bactérienne était restée en augmentation après le troisième jour pour les souches S1 et S2 à des valeurs de 6.37 ± 0.1 mg/ml et 1.57 ± 0.1 mg/ml respectivement.

Au bout de quatrième jour la biomasse bactérienne une diminution importante de la biomasse de la souche S2 a été remarquée avec une concentration de 0.5 ± 0.1 mg/ml par rapport à la souche S1 qui atteint sa croissance maximale à une valeur de 10.17 ± 0.06 mg/ml.

Durant le dernier jour, les valeurs sont diminuées à 8.11 ± 0.06 mg/ml pour la souche 1 et à 0.3 ± 0.1 mg/ml pour la souche 2 (indice de la fin de phase exponentielle et début de la phase stationnaire).

Dans le milieu MGO où les grignons d'olives est la seule source de carbone une phase de croissance rapide et continue pour les deux souches S1 et S2 avec une concentration bactérienne de 8.37 ± 0.4 mg/ml et de 4.54 ± 0.03 mg/ml respectivement dans 24 heures et qui est supérieur à celle de milieu de référence suivi par une diminution de la biomasse bactérienne à partir de 48 heures jusqu'à 96 heures pour la souche 1 à des valeurs de 6.87 ± 0.1 mg/ml jusqu'à 5.7 ± 0.2 mg/ml.

En outre, la souche 2 continue son augmentation de croissance à partir de 48 heures jusqu'à 72 heures ou elle va atteindre une valeur maximale de 6.93 ± 0.1 mg/ml. Une diminution de biomasse bactérienne pour les deux souches S1 et S2 a été remarquée à des valeurs de 1.17 ± 0.1 mg/ml et de 1.68 ± 0.1 mg/ml.

Les grignons d'olives sont riches en cellulose ainsi qu'en matière sèche, et ils contiennent une faible quantité de matière minérale. Leur composition dépend de facteurs de maturité et selon le processus d'extraction d'huile (Nefzaoui, 1984 ; Nefzaoui, 1985).

Dans le milieu MTC une phase de croissance très lente faible pour les deux souches S1 et S2 à partir de 24 heures jusqu'à 96 heures à des valeurs de 4.87 ± 0.1 mg/ml et 2.01 ± 0.1 mg/ml jusqu'à 10.75 ± 0.1 mg/ml et 3.82 ± 0.1 mg/ml respectivement.

Au bout de 120 heures la biomasse bactérienne atteint ses valeurs maximales pour la souche S1 à 25.22 ± 0.1 mg/ml et S2 à 4.54 ± 0.1 mg/ml.

Les téguments de chênes sont riches en polyphénols, ils possèdent un pouvoir antioxydant important et ils contiennent de flavonoïdes et de tanins (Balasundram et al., 2006).

Dans le milieu EPT on observe une augmentation de la biomasse bactérienne dans les premières 24 heures des deux souches S1 et S2 avec des valeurs de 7.46 ± 0.08 mg/ml et 5.68 ± 0.04 mg/ml respectivement. Cette augmentation explique l'adaptation et la capacité des souches S1 et S2 à dégrader l'amidon présent dans les épiluches de pomme de terre et elles l'utilisent comme seule source de carbone.

Après 48 heures la croissance bactérienne reste stable pour la souche S1 et elle augmente pour la souche S2 où nous avons notés des valeurs de 7.55 ± 0.3 mg/ml et 8.2 ± 0.3 mg/ml.

Les deux souches (S1 et S2) ont la capacité de produire des enzymes nécessaires pour hydrolyser l'amidon, plus précisément les amylases qui sont utilisés dans les processus industriels et les biotransformations d'amidon à cause de leur thermostabilité (Gupta et al., 2003).

Une augmentation importante est remarquée pour la souche S1 à partir de 72 heures jusqu'à 96 heures à une valeur maximale de 13.1 ± 0.3 mg/ml vis-à-vis la croissance déduite par la souche S2 dans la même durée avec une valeur de 10.59 ± 0.1 mg/ml.

Au bout de 120 heures la biomasse bactérienne a été diminuée pour les deux souches S1 et S2 à des valeurs de 7.72 ± 0.2 mg/ml et 8.54 ± 0.2 mg/ml.

D'après les résultats de croissance bactérienne obtenues pour les 4 milieux utilisés, la croissance des deux souches bactériennes S1 et S2 a été rapide et importante dans les milieux MGO, MEP et MG. Par ailleurs, elle faible dans les 3 premiers jours de la fermentation dans le milieu de téguments de chênes suivi d'une augmentation maximale par la suite dans les deux derniers jours ce qui est expliqué par l'adaptation des deux souches à synthétiser des enzymes adéquates pour la dégradation de tels source de carbone.

IV.3.2.Suivi de l'activité d'émulsification (E24)

Les résultats de suivi d'indice d'émulsification obtenus pour chaque biosurfactants des milieux de culture utilisés sont présentés dans la Figure 30 .

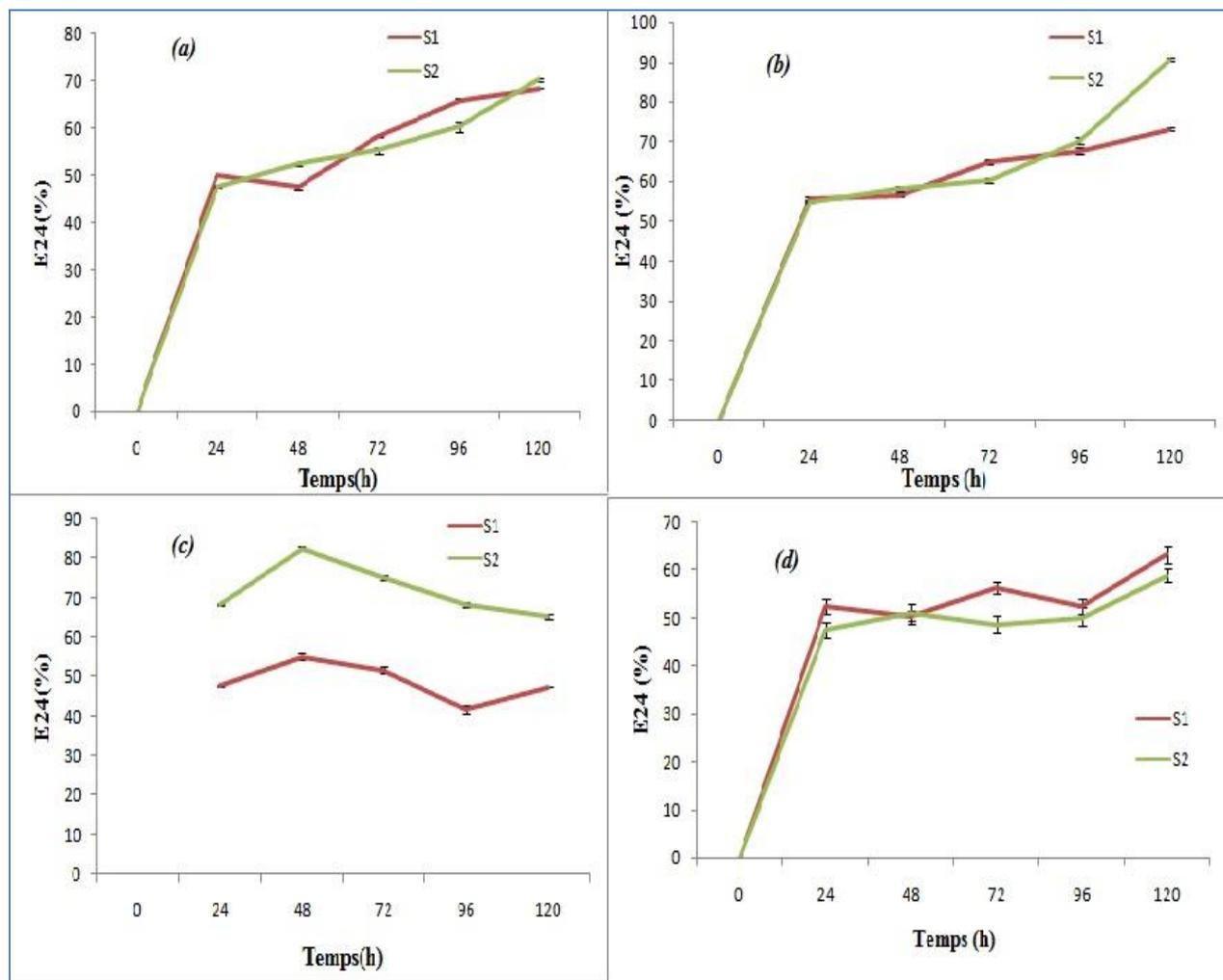


Figure 30 : Evaluation d'indice d'émulsification en fonction de temps

(a) : MGO (Milieu de grignons d'olives), (b) : MTC (Milieu de téguments de chêne),

(c) : MEP (Milieu de pelures de pomme de terre) et (d) : MG (Milieu de glucose)

D'après ces résultats obtenus de test d'émulsification, on peut déduire que les meilleurs résultats ont été obtenus dans le milieu de téguments de chênes après 24 heures de fermentation pour les deux souches S1 et S2 avec des valeurs de $55.83 \pm 0.3\%$ et $54.77 \pm 0.3\%$ respectivement. Après 48 heures une augmentation de l'activité d'émulsification a été notée avec des valeurs de $56.83 \pm 0.4\%$ pour la souche S1 et de $58 \pm 0.6\%$ pour la souche S2.

Des valeurs de $65.12 \pm 0.6\%$ et $60.25 \pm 0.6\%$ après 72 heures ont été enregistrés jusqu'à après 120 heures avec des valeurs de $73.25 \pm 0.3\%$ et $90.69 \pm 0.3\%$.

Le milieu des pelures de pomme de terre présente des valeurs de $47.72 \pm 0.1\%$ et $68.30 \pm 0.1\%$ pour les souches S1 et S2 respectivement après 24 heures suivi par des valeurs

de $55.22 \pm 0.6\%$ et $82.56 \pm 0.3\%$ après 48 heures et de $51.78 \pm 0.8\%$ et $75.21 \pm 0.6\%$ après 72 heures jusqu'à après 120 heures avec des valeurs de $47.93 \pm 0.1\%$ et $65.25 \pm 0.5\%$.

Le milieu de grignons d'olives présente un pourcentage d'émulsification de $50 \pm 0.01\%$ et $47.93 \pm 0.1\%$ pour les deux souches S1 et S2 respectivement après 24 heures de fermentation suivi des valeurs de $47.72 \pm 0.1\%$ et $52.4 \pm 0.3\%$ après 48 heures et de $58.35 \pm 0.6\%$ et $55.35 \pm 0.7\%$ après 72 heures jusqu'à après 120 heures avec des valeurs de $68.3 \pm 0.1\%$ et $70.2 \pm 0.3\%$, le milieu à base de glucose présente des valeurs de pourcentage d'émulsification de 52.2 ± 1.5 et 47.5 ± 1.5 pour les souches S1 et S2 respectivement après 24 heures et des valeurs de 63.33 ± 1.7 et 58.96 ± 1.4 après 120 heures de fermentation.

Les biosurfactants produites dans les milieux TC et EP possèdent une bonne activité pouvoir d'émulsification des hydrocarbures et un rendement important vis-à-vis aux milieux de glucose et de grignons d'olives.

Selon les travaux [Al-Dhabi et ses collègues](#) sur la valorisation des résidus de la mallasse de date, bran de riz, les pluches de banane soja et l'amidon de maïs pour la production des biosurfactants, ils ont montrés que les résultats les plus efficace d'émulsification sont ceux du milieu de base de la mélasse de date et en comparant cette remarque avec la composition chimique de ce substrat ils ont trouvés que ces milieux sont riches en saccharose ([Al-Dhabi et al, 2020](#)).

IV.3.3. Test de déplacement d'huile (DDH)

Les résultats du test de déplacement d'huile appliqué sur les surnageants des souches S1 et S2 obtenus après culture sur les quatre milieux utilisés sont présentés dans la Figure 31.

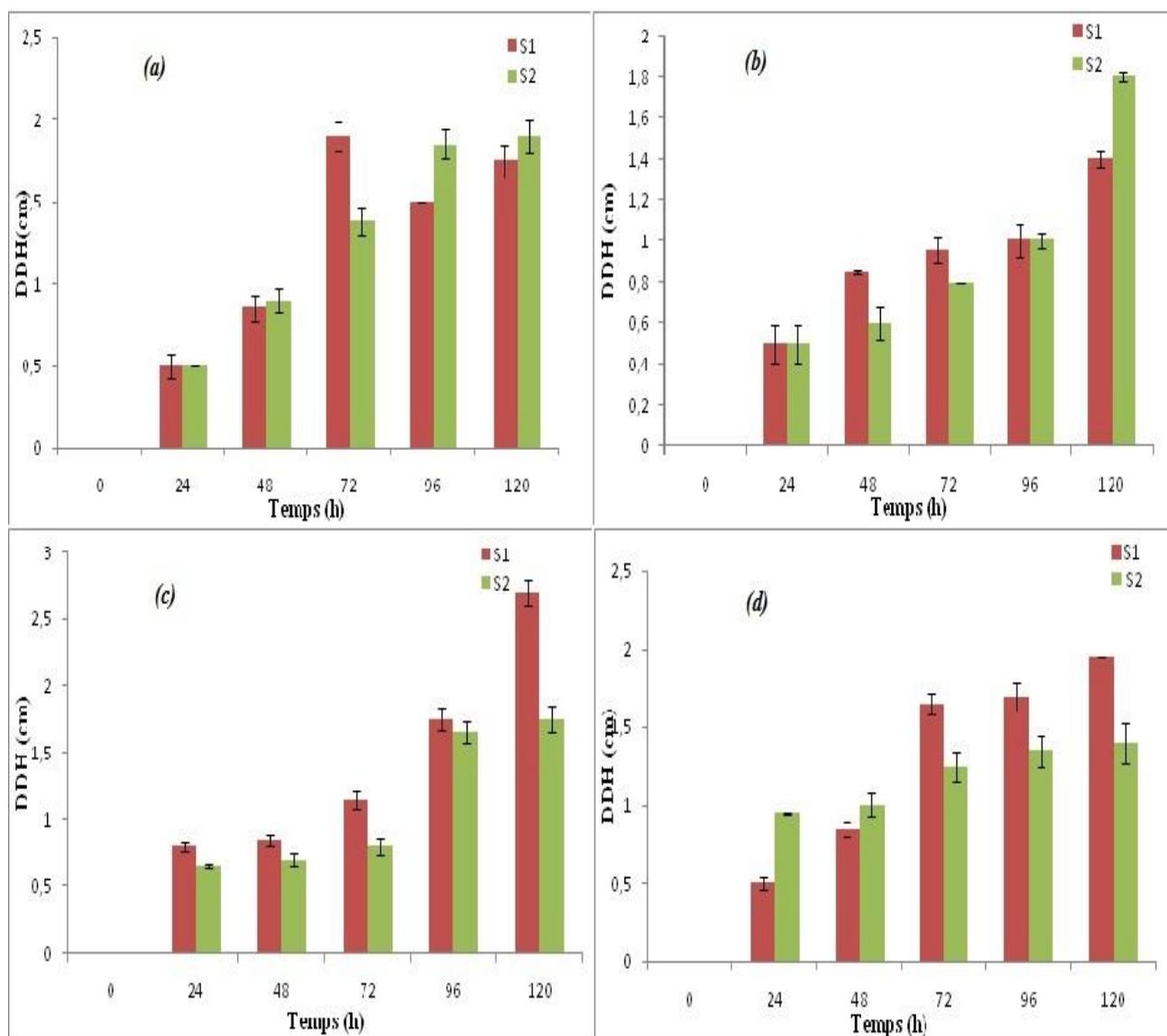


Figure 31 : Evaluation de déplacement d’huile en fonction de temps durant la fermentation
 (a) : MGO (Milieu de grignons d’olives), (b) : MTC (Milieu de téguments de chêne),
 (c) : MEP (Milieu de pelures de pomme de terre) et (d) : MG (Milieu de glucose)

Le test de déplacement d’huile a montré la formation d’un halo dans les différents surnageants obtenus des différents milieux et avec deux souches différentes S1 et S2 après centrifugation.

Ces halos ont un diamètre qui diffère d’un milieu à un autre, le meilleur résultat a été obtenu pour le milieu à base de pelures de pomme de terre dans avec un diamètre de 2.7 ± 0.1 cm et 1.75 ± 0.09 cm pour les souches S1 et S2 respectivement à la fin de fermentation (après 120 heures) suivi du milieu à base de glucose avec un diamètre de 1.95 ± 0.01 cm et 1.4 ± 0.1 cm.

Les milieux à base de tégument de chênes et de grignon d'olives ont des valeurs de diamètre faibles par rapport aux milieux précédents dont les valeurs de MGO 1.75 ± 0.1 cm et 1.9 ± 0.1 cm pour les souches S1 et S2 respectivement et les valeurs de MTC de 1.4 ± 0.04 cm et 1.8 ± 0.02 cm.

Ces valeurs obtenues assure qu'il y'avait une activité de surface qui implique la présence de biosurfactants dans les milieux utilisés mais avec efficacités et quantités différentes (Liu et al.,2013).

IV.3.4. Test des sucres réducteurs par la DNS

Le test des sucres réducteurs est un test quantitatif qui confirme la présence des sucres réducteurs dans le surnageants obtenus par les souches S1 et S2 en déduisant leur concentration en utilisant la courbe étalonnage (Annexe 05) établie dans les mêmes conditions. Cette concentration diffère selon le milieu et la souche utilisée. Les résultats de ce test sont présentés dans la Figure32.

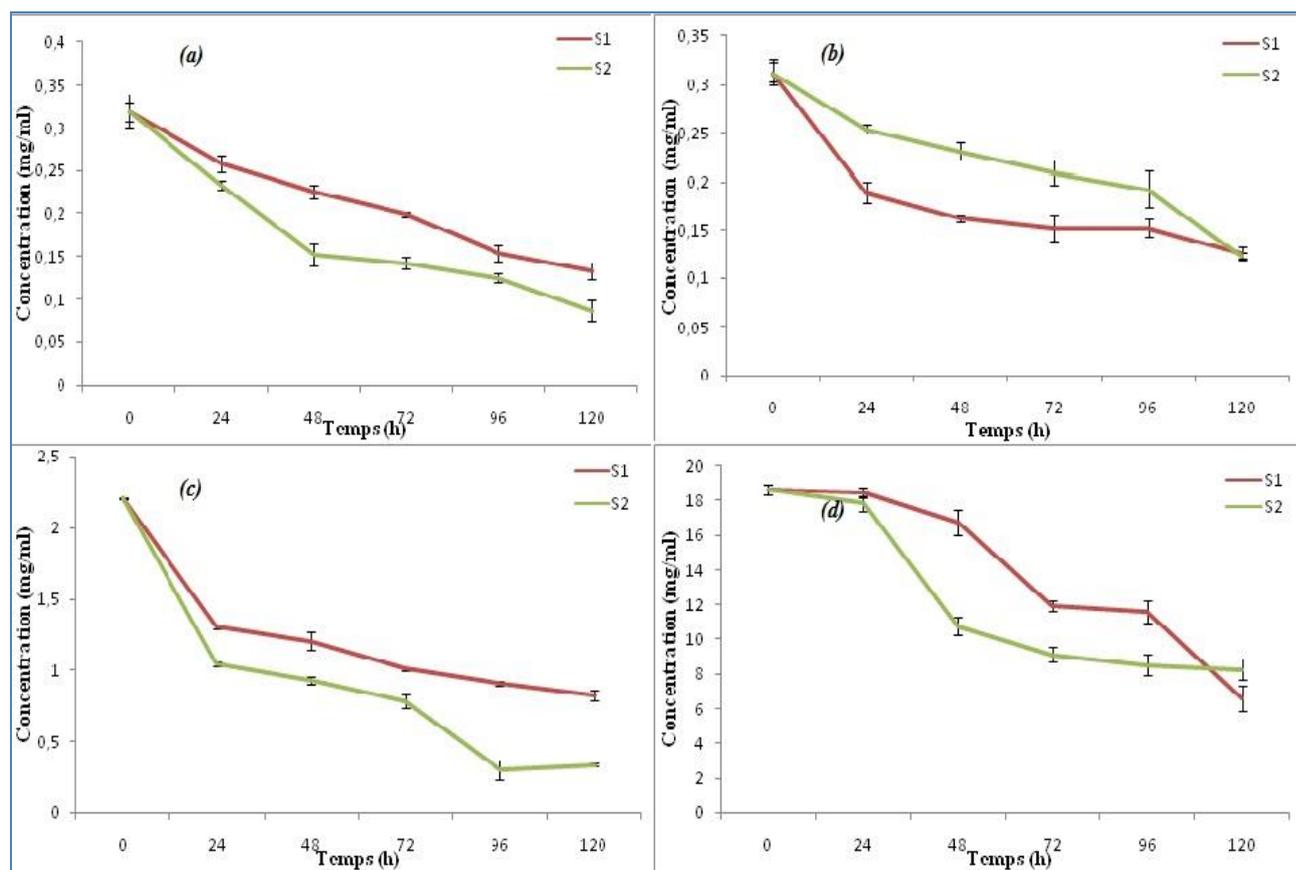


Figure 32 : Evaluation de concentration des sucres réducteurs en fonction de temps

(a) : MGO (Milieu de grignons d'olives), (b) : MTC (Milieu de téguments de chêne),

(c) : MEP (Milieu de pelures de pomme de terre) et (d) : MG (Milieu de glucose)

Pour le milieu MGO, une diminution de concentration des sucres a été enregistré avec des valeurs de 0.31 ± 0.01 mg/ml et 0.31 ± 0.02 mg/ml jusqu'à 0.25 ± 0.009 mg/ml et 0.23 ± 0.005 mg/ml pour les souches S1 et S2 après 24 heures de fermentation. Cette diminution de concentration est continu jusqu'elle a atteint ses valeurs minimales pour les deux souches S1 et S2 après 120 heures, fin de fin fermentation, avec des valeurs de 0.13 ± 0.009 mg/ml et 0.08 ± 0.01 mg/ml respectivement.

Pour le milieu MTC la concentration de sucres réducteurs a été diminué à des valeurs de 0.18 ± 0.01 mg/ml et de 0.25 ± 0.004 mg/ml d'après 24 heures pour les souches S1 et S2 respectivement jusqu'à après 120 heures 0.12 ± 0.007 mg/ml et 0.12 ± 0.002 mg/ml.

Pour le milieu MEP, la concentration a été diminuée des valeurs de 2.2 ± 0.007 mg/ml et 2.2 ± 0.002 mg/ml pour S1 et S2 respectivement suivi d'une diminution très rapide après 24 heures à des valeurs de 1.3 ± 0.02 mg/ml et 1.04 ± 0.01 mg/ml. En outre pour le milieu MG les valeurs sont compris entre 18.62 ± 0.3 mg/ml pour les deux souches S1 et S2 6.6 ± 0.7 mg/ml et 8.26 ± 0.6 mg/ml jusqu'à après 120 heures.

D'après les résultats précédents, les deux souches S1 et S2 ont utilisé les différents sucres présents dans les quatre milieux utilisés pour leur croissance en biomasse et production de leurs métabolites comme le biosurfactants secrété dans le moût de la fermentation.

IV.4. Extraction des biosurfactants

Les résultats de masse obtenus des biosurfactants après extraction par solvant et ceux obtenus après extraction par précipitation par HCL et après lyophilisation (Annexe 04), sont enregistrés dans le tableau suivant.

Tableau 07 : Rendement des biosurfactants après extraction par solvant.

| Extraction par solvant | | | | |
|-----------------------------------|-----------------|----------------|------------------|-------------------|
| | MGO (mg/ml) | MTC (mg/ml) | MEP (mg /ml) | MG (mg /ml) |
| Souche S1 | 41 ± 0.03 | 83.1 ± 0.1 | 133.35 ± 0.1 | 223.4 ± 0.007 |
| Souche S2 | 43.85 ± 0.02 | 46.1 ± 0.2 | 81.55 ± 0.2 | 104.7 ± 0.09 |
| Extraction par Acide (HCl) | | | | |
| Souche S1 | 95.2 ± 0.01 | 55.25 ± 0.3 | 113.37 ± 0.07 | 69.45 ± 0.04 |
| Souche S2 | 35.8 ± 0.03 | 35.85 ± 0.8 | 100.75 ± 0.05 | 126.45 ± 0.006 |

Selon ces résultats, le rendement des biosurfactants est très important dans les milieux de pomme de terre avec des valeurs de 113.37 mg /ml et 100.75 mg pour les souches S1 et S2 respectivement dans la méthode d'extraction par précipitation acide (HCL). Tandis que l'extraction par solvant a donné les meilleurs rendements, où des taux de 223.4 mg /ml et 104.7 mg/ml ont été notés pour la souche S1 et S2 respectivement sur le milieu à base de glucose comme seule source de carbone (MG).

Des résultats semblables sont obtenus d'après les travaux de [Al-Dhabi et ses collègues](#) qui ont utilisé le caroubier comme seule source de carbone pour la production de biosurfactants par la souche *Bacillus sp.*, ils ont obtenu un rendement de 0.184 mg/ml ([Al-Dhabi et al, 2020](#)).

D'après les travaux et les résultats de [Bengoechea et ses collègues](#), les bactéries ont un pouvoir de rendement de production de biosurfactants important dans les milieux à base des sucres simples ([Bengoechea et al., 2008](#)).

Conclusion

L'objectif de ce présent travail est d'avoir des biosurfactants moins couteux avec des propriétés de tension active intéressante. Pour cela nous avons examiné la valorisation des sous-produits agroalimentaires (Pelure de pomme de terre ; grignon d'olive ; tégument de chêne vert et le glucose) pour la production de biosurfactants par deux souches S1 et S2.

Les résultats obtenue ont montré que :

*Les biosurfactants issus des milieux à base de pelures de pomme de terre et des téguments de chêne ont des indices d'émulsification importants à des valeurs de de 82.56% et 90.63% respectivement par rapport au milieu de glucose et de grignons d'olive.

*Les biosurfactants issus des milieux à base de glucose et pomme de terre ont un diamètre d'halo très grand à des valeurs 1.95 cm et 2.7 cm respectivement vis-à-vis aux milieux à base de téguments de chênes et de grignons d'olives.

*Le rendement des biosurfactants est important pour les milieux à base des pelures de pomme de terre et de glucose qui ont donné des valeurs de à 113.37 mg/ml et de 126.45 mg/ml respectivement.

A la lumière de ce travail, il est souhaitable de compléter cette étude par des expérimentations et des approches plus approfondies, plusieurs perspectives peuvent être dégagées à savoir :

- Une approche moléculaire de nos souches isolées aiderait à déterminer le gène codant la production des biosurfactants et l'étude des différents mécanismes de cette production;
- Détermination des facteurs affectant la production des biosurfactants par les souches étudiées en utilisant le logiciel d'optimisation ;
- Application de ces biosurfactants dans les différents domaines tels que pharmaceutique, agroalimentaire et environnemental.
- Enfin, il est souhaitable de réaliser une production de biosurfactant à l'échelle pilote dans un bioréacteur sur ces substrats.

*Références
bibliographiques*

A

- Abdel-Mawgoud. A.M., Lépine F., Déziel E. (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**(5), 1323-1336.
- Arapoglou D., Vlyssides A., Haidemenaki K., Malli V., Marchant R., Israilides C. (2009). Alternative ways for potato industries waste utilisation. In: *Proceedings of the 11th International Conference on Environmental Science and Technology*, Chania, Crete, Greece, (3–5 September).
- 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.

B

- Baldent F. (1997).Coloration usuelle en Bactériologie .Revue de développement et de santé .Février (1997).www.Ledamed.org.
- Balasundram N., Sundram K., Samman S. (2006) .Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Banat I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants : *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.
- Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants : *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), 495-508.
- Bodour A A., Gerrero-Barajas C., Maier M (2004). Structure and characterization of Flavolipids, a novel class of Biosurfactants produced by . Strain MTN11 : *App and Env Microbiol*, 10(6): 1114-20.
- Bouhadjra K., Lemlikchi W. et Oubagha N. (2017). Valorisation des pelures de pommes de terre pour le traitement d'une solution aqueuse contenant un colorant textile. *J. Wat. Env. Sci. Vol. 1, (Numéro spécial ICWR 2) (2017)*, 219-229.
- Boulal A., Benbrahim Z., Benali B et Ladjel S. (2013).Etude comparative de rendement de la production d'éthanol de deux variétés de dattes communes de faible valeur commerciale (Tinaceur et Aghmou) de Sud-Ouest de l'Algérie. *Revue des Engries Renouvables VOL.16 N°3 :593-550.*

- Boutin E., Blais J., Mercier G., Drogui P et Chartier M. (2010). Valorisation de coproduits de l'industrie agroalimentaire par production de compost de haute qualité. 37- 156.
- Botineau M. (2010). Botanique systématique et appliqué des plantes à fleurs. Édition Tec et doc ; Lavoisier. Paris.
- Bicochi S et Bonneaud B. (2007). Valorisation des déchets comme matériaux en Europe : Etat des réglementations, freins et stimulants. , 196, n°05-0908/1A

C

- Cabanis J. C., Cabanis M. T., Cheynier V. et Teissedre P. L. (1998) Caractérisation de la matière première et des produits élaborés dans Oenologie: fondements scientifiques et technologiques. Eds Flanzy, C., Lavoisier, Tec & Doc, Paris : 291-336.
- Callaghan B., Lydon H., Roelants S.L., Van Bogaert I.N., Marchant R., Banat I.M et Mitchell C.A. (2016). Lactonic Sphorolipids in crease tumor burden in Apcmin+/-mice. PloS one, 11(6), e0156845.
- Canler J-P. (2005). Dysfonctionnement biologique des station d'épuration :Origine et solution Group Gis Biostep Doc & Tech FNDAE n °33 : 100-104.
- Campos JM1., Stamford TL., Sarubbo LA., De Luna JM, Rufino RD et Banat IM. (2013).Microbial biosurfactants as additives for food industries. Biotechnol Prog. Sep-Oct; 29(5):1097-1108.
- Chapoutot P., Rouillé B, Sauvanti D. et Renaud B. (2018). Les coproduits de l'industrie agro-alimentaire : des ressources alimentaires de qualité à ne pas néglige.
- Chapouto P., Rouillé B., Sauvant D et Renaud B.(2019). Les coproduits de l'industrie agro-alimentaire : des ressources alimentaires de qualité à ne pas négliger : INRAE Productions Animales, 31(3) : 201–220
- Chrzanowski Ł., Dziadas M., Ławniczak Ł., Cyplik P., Białas W., Szulc A., Lisiecki P. et Jeleń H. (2012). Biodegradation of rhamnolipids in liquid cultures: Effect of biosurfactant dissipation on diesel fuel/B20 blend biodegradation efficiency and bacterial community composition. Biores Technol. 111:328–335.
- Communauté Européenne. (2009).Définition des produits et sous-produits animaux de catégorie 1, 2 et 3, selon la réglementation européenne. TAHD-DSAT-IE.
- Cortés-Sánchez A., J., Hernández-Sánchez H., Jaramillo-Flores M.E. 2013. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. Microbiological Research, 168(1), 22-32.

Cooper D.G., Liss S.N., Longay R. et Zajic J.E. (1989). Surface activities of *Mycobacterium*.

D

Davidovic A. (2006). Matériaux biodégradable à base d'amidon expansé renforcé de fibres s naturelles application a naturelles application à l'emballage alimentaire Thèse Doctorat spécialité physicochimie des polymères, université du Sud Toulon var France 201p.

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.

Debabza M. (2015). Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de doctorat d'état, Université Badji Mokhtar-Annaba, pp. 5-60-61-62-63-64-65.

Desai J., Banat I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential : Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61(1), 47-64.

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.

Douglas G. Hayes D., Solaiman K.Y. et Richard D. (2019). Biobased Surfactants Synthesis, Properties, and Applications: 41-63.

Dussault H.P. (1995). An Improved Technique For Staining Red Red Halophilic Bacteria. J. Bacteriol. 70(4): 484-485.

E

Emtiazi G., Saleh T., Hassanshahian M. (2009).The effect of bacterial glutathione S transferase on morpholine degradation. Biotechnol. 4: 202 -205.

F

Favier J., Ireland Ripet J., Toque C. et Feinberg M. (1995). Répertoire général des aliments Table de composition INRA, CNEVA, Ciquel Tec et Doc /Paris p 897.

Février C., Willequet F. (2009). Valorisation par l'alimentation animale. In: Moletta, R., 2009. Le traitement des déchets, Lavoisier Tech & Doc.

Finnerty W. R. et Kappeli O. (1979). Partition of Alkane by an Extracellular Vesicle Derived from Hexadecane-Grown *Acinetobacter*. Department of Microbiology, University of Georgia, Athens, Georgia 30602. JOURNAL OF BACTERIOLOGY: 707-712.

Franca I.W.L., Lima A.P., Lemos J.A.M., Lemos C.G.F., Melo V.M.M., de Sant'ana. H.B et Gonçalves L.R.B. (2015). Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. Catalysis Today; **255**:10-15.

Francy D.S., Thomas J. M., Raymond R. L., Ward C. H. (1991). Emulsification of hydrocarbon by surface bacteria. J Industrial Microbiol, 8: 237-46.

G

Galliard J. (2020). Appel à témoignage pour un projet autour des grignons d'olive consulter le 12 mars 2022 à 17.41.

Guillaume B. (2015). Méthanisation : Service Prévention et Gestion des Déchets Direction Consommation Durable et Déchets - ADEME Angers.

Gupta R., Gigras P., MohapatraH. et al. (2003). Microbial α - amylases : a biotechnological perspective. Process Biochem., 38:1599 -1616.

Gurtler J. L. (2008). Biocarburants : développement et perspectives. OCL vol. 15 N° 4. Disponibsur sur le site <http://www.ocl-journal.org> ou <http://dx.doi.org/10.1051/ocl.2008.0215>

Grigoras C. G. (2012). Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs. Thèse de Doctorat en Chimie Génie de l'environnement, Université d'Orléans et Université « Vasile Alecsandri » de Bacău. 247.

H

Haba E., Pinazo A., Jauregui O., Espuny M.J., Infante M.R. et Manresa A. (2003). Physicochemical Characterization and Antimicrobial Properties Of rhamnolids produced by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCBIM 40044, Biotechnology and Bioengineering, 81, (3):316-322.

- Hagerman A., Riedl K., Jones G A.,Sovik K N., Ritchard N T., Hartzfeld P. W. et Riechel T. L.(1998).High Molecular Weight Plant Polyphenolics (Tannins) as Biological Antioxidants. *Agric Food Chem.* 46(5):1887-1892. doi: 10.1021/jf970975b.
- Hassanshahian M. (2014). The effects of crude oil on marine microbial communities in sediments from the Persian Gulf and the Caspian Sea: A microcosm experiment. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research* 2: 1-17.
- Healy M.G., Devine C.M. et Murphy R. (1996). Microbial production of biosurfactants, *Resources, Conservation and Recycling*, 18:41-57.
- Henkel M., Geissler M., Weggenmann F., Hausmann R. (2017). Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnology journal*, **12**(7) : 1600561.
- Heuzé V., Thiollet H., Tran G., Sauvant D., Bastianelli D et Lebas F.(2020). Sugar beet pulp, dehydrated. *Feedipedia*, a programm by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO. <https://feedipedia.org/node/24378> Last updated on February 27, 16:09.
- Hutin A. (2019).Les petits savoirs du physicochimiste : Les tensioactif.

I

- Ifermer (2010). La valorisation des co-produits. Fiches téléchargeables sur <http://www.bibliomer.com>
- Isara (2020). Fermentation des sous-produits végétaux issus de l'agroalimentaire [consulté le 12 mars 2022 à h 20 :25].

J

- Jacques P. (2011). Surfactin and Other Lipopeptide from *Bacillus spp.* In: Sober Ón-Chavez G. (ed), *Biosurfactants, Microbiology Monographs* 20, Sringer-Verlag (Berlin): 58-83.
- Johnson J.L., Phelips S.L., Cummins C.S., London J., Gasser F. (1980). Taxonomie of *Lactobacillus acidophilus* group, *international journal of systematic Bacteriology*, 30 :53-68.
- Juz et Bukasov [archive], sur *Plants for a Future* [consulté 8 mai 2020].

K

- Kannika C. (2003). Diversity of halophilic bacteria in saline soil nongboreservoir, Mahasarakham 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.
- KapadiaSanket G. and Yagnik B. N. Current Trend and Potential for Microbial Biosurfactants.2013. Asian J .Exp .BiolSci. 4(1).
- Kappeli O., Finnerty W.R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derive From hexadecane grown *Acinetobacter*. J. Bacteriol, 140, 707–712.
- Khopade A., Biao R., Liu X., Mahadik K., Zhang L. et Kokare C. (2012a). Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiosis sp.* B4', Desalination, 285: 198-204.
- Kouassi E.K.A., Soro Y., Garcia C.V. et Kouassi .B.Y. (2017). Valorisation des déchets d'agroressources par bioproduction d'acide citrique. Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie J. Soc. Ouest-Afr. Chim. (2017), 044 : 36 – 42.
- Koumiche F. (2016). Effet de quelques traitements physiques sur la germination des glands et la croissance ultérieure des plants de chêne vert (*Quercus ilex*).Thèse de master en protection des forêts. Université de Tlemcen. 57.

L

- Lawniczak L.,MarecekR. et Chrzanowski Ł.(2013).Contribution of biosurfactants to natural or inducedbioremediation.AppliedMicrobiology and biotechnology.97 :2327 -2339.
- Lecompte J.(2017). Innover en valorisant vos sous-produits alimentaires. Cintech agroalimentaire.
- Lemétayer J. et Mellirrot J. (2020).Les coproduits d'origine végétal des industries agroalimentaires. ADEM.
- Liu J., Vipulanandan C., Cooper T. F. et Vipulanandan G. (2013). Effects of Fe nanoparticles on bacterial growth and biosurfactant production. J Nanopart Res 15(1): 1-13.

Liu J., Yitan C., Yurpeng J.(2013). Screening and evaluation of biosurfactant-producing strains isolated from oil field waste water. *Indian journal of microbiology*.53:168-174.

Luna J.M., Rufino R.D., Sarubbo L.A., Campos-Takaki G.M. (2013).Characterisation, surface properties and biological activity of a biosurfactant produced from industrial waste by *Candida sphaerica* UCP0995 for application in the petroleum industry. *Colloids and Surfaces, B:Biointerfaces*, 102 :202-209.

M

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

Makkar R.S. et Cameotra S.S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications, *Appl : Microbiol. Biotechnol.* 58, 428-434.

Markets et Markets. (2016). <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactantsmarket-493.html>

Martory B. et Capul J.Y. (2005).Economie générale, éd. Armand Collin, Paris,14.

McClements D.J. et 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.

Michele A. S., Isabella G. L., Ana C. A., Erica S. Patr'icia M. A., Harish K.C., João V. B.(2021). Production of Biosurfactants by *Ascomycetes*. *International Journal of Microbiology*, 10.1155:11 .

Mohan P.K., Nakhla G.et Yanful E.K. (2006). Biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic, and anaerobic conditions. *Journal of Environmental Engineering*, 132(2): 279-283.

Moletta R. (2012). La biogaz vallée : le cluster de la méthanisation en France .Le conseil général l'Aube et Holding vert.

Morikawa M., Daido H., Takao T., Satoru M., Shimonishi Y. et Imanaka T. (1993). A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter sp.* strain MIS38 : *Journal of Bacteriology*, 175 : 6459-6466.

Mukherjee A.K. et Das K. (2010). Microbial surfactants and their potential applications: An overview. *Adv Exp Med Biol* 672:54–64.

Muller F. (2016). L'épandage. Service Mobilisation et Valorisation des Déchets Direction Economie Circulaire et Déchets. ADEME Angers.

Muthusamy K., Gopalakrishnan S., Ravi T.K., et Sivachidambaram P. (2008). Biosurfactants: Properties, commercial production and application. *Curr. Sci.*, 94: 736-747.

N

Nefzaoui A. (1984). Importance de la production oléicole et des sous-produits de l'olivier.

Nefzaoui A. (1985). Valorisation des lignocellulose dans l'alimentation des ruminants par les traitements des alcalis : Application aux grignons d'olive. Thèse de doctorat d'Etat université Catholique de Louvain.

Niels W., Thi Ai D., Janfelt C. et Severin H. (2013). N-acylation of phosphatidylethanolamine and its biological functions in mammals ", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1831(3): 652-662.

O

Ocampo G.y., Cutiono G.S., Gonzalez C.B. et Villarreal A.W. (2017). Valorisation des déchets agro-industriels pour la production des biosurfactants par des bactéries natives du chipas . *Agriculture ouverte* : 341-349.

Ongena M. et Jacques P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol : *Trends in microbiology*, 16(3), 115-125.

Oliveira M.R., Magri A., Baldo C., Camilios-Neto D., Minucelli T., Celligoi M.A.P.C. (2015). Sophorolipids A promising biosurfactant and its applications. *Int J Adv Biotechnol Res*, 6 :161-174.

P

- Pacwa-Plociniczak M., Plaza G.A. et Piotrowska -Seget Z. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci*;12:633–654.
- Pereira J.F.B., Gudiña E.J., Costa R., Vitorino R., Teixeira J.A., Coutinho J.A.P. et Rodrigues L.R. (2013). Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolate towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*. 111: 259–268.
- Plassard D. (2020). Les sous-produits animaux et les produits qui en sont dérivés. Équarrissage.
- Poré J. (1992). Emulsions, microémulsions, émulsions multiples, Editions Techniques et Industries des Corps Gras : 270.

R

- Réséda/ADEME.(2008). Enquête sur les gisements et la valorisation des coproduits issus de l'agro-industrie, Rapport d'étude, 12.
- Réséda. (2017). Gisements et valorisations des coproduits des industries agroalimentaires.- Maquette : nicole.cornec@wanadoo.fr - Imprimerie La Familiale.
- Rodrigues L., Banat I.M., Teixeira J., Oliveira R. (2006). Biosurfactants: potential applications in medicine : *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4): 609-618.
- Ronald M. (1997). Handbook of microbiological media. 2e éd. ATLAS CRC.
- Roy A.(2014). Production and characterization of biosurfactant from bacterial isolates :Netaji Subhas Institute of Technology.

S

- Sachdev Dhara P. et Cameotra-Swaranjit S. (2013). Biosurfactants in agriculture : *Appl Microbiol Biotechnol* 97:1005–1016.
- Sarir R. (2016). Etude comparative de la croissance végétative et du développement de jeunes semis de trois espèces de chênes (chêne vert, chêne liège et chêne zéen) cultivés en pépinière. Thèse de master en protection des forêts. Université de Tlemcen. 59.

- Santos D., Rufino R., Luna J., Santos V et Sarubbo L. (2016). Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401.
- Sebban A., Bahloul A., Saadoune M., Ait Kassi A., Berrada M., Pineau J.L., Kitane S. (2004). Schéma de valorisation des grignons d'olives produits par les maâsras marocaines. *Déchets sciences & techniques*, 34 : 39-43.
- Settia C., Dilmi-Bouras A., Meziane M., Bouderoua K. et Settic H. (2020). Activités antioxydantes et antibactériennes du gland de chêne vert (*Quercus ilex*) d'Algérie Sud-asiatique *J Exp Biol*; 10(5): 285-291.
- Shekhar S., Sundaramanickam A. et Balasubramanian T. (2015). Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(14): 1522-1554.
- Silva R. C. F. S., Almeida D. G., Luna J. M., Rufino R. D., Santos V. A. et Sarubbo L. A. (2014). Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills, *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 12523-12542, DOI: 10.3390/ijms150712523.
- Simmons J.S. (1926). A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolation of certain fungi. *J. Infect. Dis.* : 39 : 209.

V

- Vesina L. et Lacroix M. (2000). Classical biochemical test for the identification *Pectobacterium* (*Erwinia pectinolytica*) et des *Pseudomonas fluorescens*. *Laboratoire de diagnostic en phytoprotection-MAPAQ.9*.
- Vijayakumar S. et Saravanan V. (2015). Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*, 10 : (5), 181.

W

- Wertz Jean L. (2011). L'amidon et le PLA : deux bio polymères sur le marché.

Y

Yanez-Ocampo G.y., Cutiono G.S.,Gonzalez C.B. et Villarreal A.W. (2017). Valorisation des déchets agro-industriels pour la production des biosurfactants par des bactéries natives du chipas .Agriculture ouverte,341-349.

Yalaoui-Guellal D., Brahmi F., Touati A., De Champs C., Banat I. M. et 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., Temzi S., Djafri-Dib S., Brahmi F., Banat I. M et Madani K.(2020). Biodégradation potentiel 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.

Yamane T. (1987). Enzyme technology for the lipidindustry: an engineering overview, J. Am. Oil. Chem. Soc. 64:1657–1662.

Z

Zenati B. (2018). Biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines: Application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole.

Annexes

Annexe N°1 : Matériels et équipements utilisés.

| | |
|----------------------------------|-----------------------|
| Autoclave | Agitateur |
| Centrifugeuse | Micropipette |
| Incubateur | Plaque chauffante |
| Réfrigérateur | Étuve |
| Balance | pH mètre |
| Erlemmeyer | Hotte chimique |
| Tubes a essai | Hotte Microbiologique |
| Béchers | Bec bunsen |
| Flacons | Vortex |
| Eprouvette | Spatule |
| Boite pétrie en verre | Spectrophotométrie |
| Boite pétrie en plastique | Tamis |

Annexe N°2 : Milieux de culture et solution préparés

L'utilisation des milieux de culture se fait après l'ajout de l'eau distillée (QSP 1000 ml) et bien chauffé le mélange et après l'ajustement de pH et autoclavé le mélange à 120°C pendant 20 minutes .Pour solidifier le milieu, il suffit d'ajouter l'agar Agar en quantité suffisante (Ronald, 1997).

➤ Gélose nutritive

| | |
|---------------------|--------|
| Extrait de viande | 1,0g |
| Extrait de levure | 2,0g |
| Peptone | 5,0g |
| Chlorure de sodium | 5,0g |
| Agar | 15,0g |
| Eau distillée (QSP) | 1000ml |

pH 7,4

➤ **Tryptone (g/l)**

| | |
|----------------------------|-------|
| | |
| Tryptone. | 15,0g |
| Agar | 15,0g |
| Peptone papainique de soja | 5,0g |
| Chlorure de sodium | 5,0g |

pH=7.3 ± 0.2

➤ **Milieu Salé Minéral (MSM)**

| | |
|--------------------------------------|--------|
| NaCl | 30g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0g |
| NH ₄ NO ₃ | 1,0g |
| Na ₂ HPO ₄ | 3,0g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,7g |
| Solution de traces d'éléments | 1,0ml |
| Eau distillée qsp | 1000ml |

pH = 7,2 ± 0,2

➤ **Le bouillon nutritif (milieu liquide) (BN)**

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Extrait de levure | 4,0 g |
| Tryptone | 5,0 g |
| Glucose | 50,0 g |
| Dihydrogénophosphate de potassium | 0,55 g |
| Chlorure de potassium | 0,425 g |
| Chlorure de calcium | 0,125 g |
| Chlorure ferrique | 0,0025 g |
| Sulfate de manganèse | 0,0025 g |
| Vert de bromocrésol | 0,022 g |

pH = 5,5 ± 0.2

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

| | |
|--------------------------------------|--------|
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 10mg |
| CuSO ₄ .H ₂ O | 0,50mg |
| MnSO ₄ H ₂ O | 0,50mg |
| CaCL ₂ | 20mg |
| FeCL ₃ | 30mg |
| Eau distillée qsp | 1000ml |

➤ **Acétate de plomb**

| | |
|-------------------|--------|
| Anhydre. | 3,25g |
| Trihydrate | 2,55g |
| Décahydrate | 1,69g |
| 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 ± 0,2

➤ **Urée-indole**

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

➤ **Triple Sugar iron (TS.I)**

| | |
|-------------------------------|---------|
| Tryptone | 14g |
| Extrait autolytique de levure | 3 g |
| Extrait de viande | 3 g |
| Glucose | 1 g |
| Lactose | 10 g |
| Saccharose | 10 g |
| Chlorure de sodium | 5 g |
| Thiosulfate de sodium | 0,3 g |
| Citrate ferrique ammoniacal | 0,3 g |
| Rouge de phénol | 0,024 g |
| Agar agar bactériologique | 13,5 |

pH final : $7,4 \pm 0,2$

Annexe N°3 :

Préparation de DNS

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

-Solution 01

| | |
|--------------------|-------|
| tartrate de sodium | 300g |
| Potassium | 300g |
| 'eau distillée | 500ml |

Solution 02-

| | |
|--------------|-------|
| DNS | 10g |
| soude à 2 N. | 200ml |

Annexe N°4 : Figures des résultats obtenus

- **Les Résultats d'extraction par solvant**

Après l'extraction de BS par solvants chloroforme/méthanol et séchage, le produit final est lyophilisé(Figure)

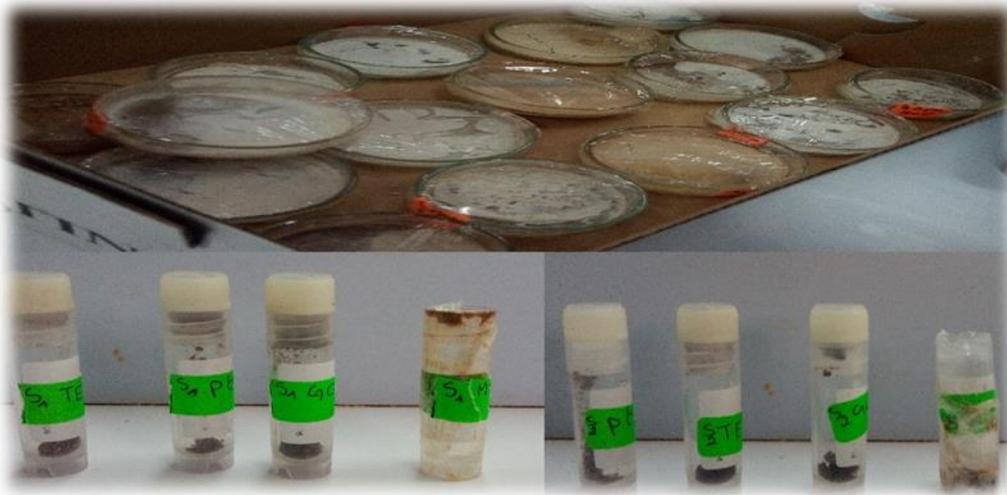


Figure 1 : les biosurfactants après lyophilisation

- **Les résultats d'E24**

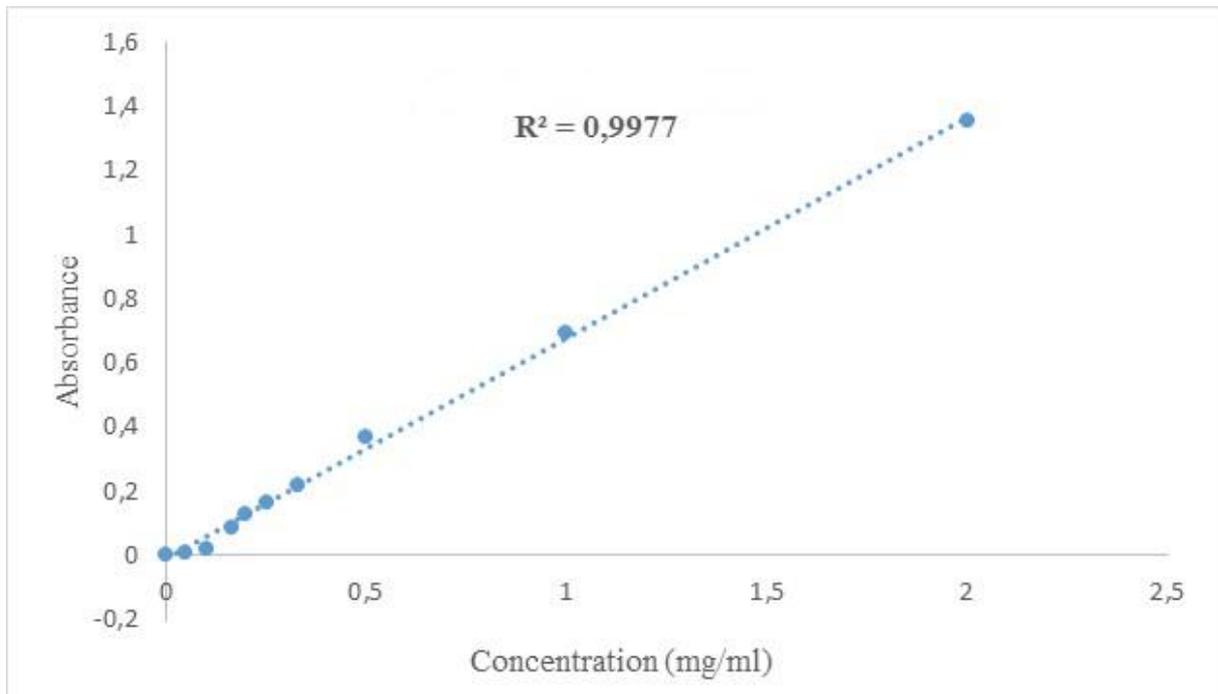
Les résultats de l'indice d'émulsification obtenue sont mesurés dans la première heure après le début d'apparition d'émulsification et après 24h



Figure 2 : Les résultats de l'indice d'émulsification

Annexe N°5 Courbe d'étalonnage

- La courbe d'étalonnage

**Figure 3:** Courbe d'étalonnage

Résumé : Le but de ce travail est d'utiliser les sous-produits agroalimentaires riches en nutriments comme source de carbone pour la production des biosurfactants à partir des deux souches S1 et S2. Cette valorisation est faite pour l'objectif de réduire le gaspillage alimentaire. La première partie concerne l'identification des souches S1 et S2 utilisées dans cette production et d'après les tests réalisés ces souches ont été coccobacilles gram positif. La deuxième partie concerne l'estimation de la production des biosurfactants sur les quatre milieux, les éplucheurs de pomme de terre (MEPT), les grignons d'olive (MGO), les téguments de chêne vert (MT) et de glucose (MGO) qui a été suivi par trois tests tout au long la fermentation : indice d'émulsification (E24), test de déplacement d'huile (DDH) et dosage des sucres réducteurs (DNS). Les résultats du test d'émulsification montrés ces résultat pour la souche 1 et la souche 02 respectivement après 120 h $273.25 \pm 0.3\%$ et $90.69 \pm 0.3\%$ pour le milieu de tégument de chêne vert ; $47.93 \pm 0.1\%$ et $65.25 \pm 0.5\%$ pour les éplucheur de pomme de terre ; $68.3 \pm 0.1\%$ et $70.2 \pm 0.3\%$, pour le glucose et de 63.33 ± 1.7 et 58.96 ± 1.4 pour les grignon d'olive et pour les résultats de déplacement montrés que le diamètre d'halo pour souche 01 et souche 02 est 1.95 ± 0.01 cm et 1.4 ± 0.1 cm pour le glucose et de 2.7 ± 0.1 cm et 1.75 ± 0.09 cm pour les éplucheur de pomme de terre ; 1.75 ± 0.1 cm et 1.9 ± 0.1 pour les grignon d'olive et 1.4 ± 0.04 cm et 1.8 ± 0.02 cm. Le rendement de biosurfactants produits par les deux souches vis-à-vis les milieux utilisés différents a été déterminé après une extraction par précipitation acide et par solvant. Le rendement le plus élevé a été obtenu dans le milieu à base de pelures de pomme de terre avec un taux 113.37 ± 0.07 pour la souche 1 et 100.75 ± 0.05 pour la souche 2

Mots clé : Biosurfactants, sous-produits agroalimentaires, Indice d'émulsification (E24), Test de déplacement d'huile (DDH), Dosage des sucres réducteurs (DNS).

Abstract: The purpose of this work is to use nutrient-rich agri-food by-products as a carbon source for the production of biosurfactants from the two strains S1 and S2. This valuation is made for the purpose of reducing food waste. The first part concerns the identification of the S1 and S2 strains used in this production and according to the tests carried out these strains were gram positive coccobacilli. The second part concerns the estimation of the production of biosurfactants on the four media, potato peelers (MEPT), olive pomace (MGO), holmoak teguments (MT) and glucose (MGO) which was followed by three tests throughout the fermentation: emulsification index (E24), oil displacement test (DDH) and dosage of reducing sugars (DNS). The results of the emulsification test showed these results for strain 1 and strain 02 respectively after 120 h $273.25 \pm 0.3\%$ and $90.69 \pm 0.3\%$ for the holmoak tegument medium; $47.93 \pm 0.1\%$ and $65.25 \pm 0.5\%$ for potato peelers; $68.3 \pm 0.1\%$ and $70.2 \pm 0.3\%$, for glucose and 63.33 ± 1.7 and 58.96 ± 1.4 for olive pomace and for the displacement results shown that the halo diameter for strain 01 and strain 02 is 1.95 ± 0.01 cm and 1.4 ± 0.1 cm for glucose and 2.7 ± 0.1 cm and 1.75 ± 0.09 cm for potato peelers; 1.75 ± 0.1 cm and 1.9 ± 0.1 for olive pomace and 1.4 ± 0.04 cm and 1.8 ± 0.02 cm. The yield of biosurfactants produced by the two strains against the different media used was determined after acid precipitation and solvent extraction. The highest yield was obtained in the medium based on potato peels with a rate $\pm 113.370.07$ for strain 1 and 100.75 ± 0.05 for strain 2.

Keywords: Biosurfactants, food by-products, emulsification index (E24), oil displacement test (DDH), assay of reducing sugars (DNS).

ملخص الهدف من هذا العمل هو استخدام المنتجات الثانوية للأغذية الزراعية الغنية بالمغذيات كمصدر للكربون لإنتاج المواد الخافضة للتوتر السطحي من السلالتين 1 و 2. تم إجراء هذا التقييم لغرض تقليل هدر الطعام. يتعلق الجزء الأول بتحديد السلالات 1 و 2 المستخدمة في هذا الإنتاج ووفقاً للاختبارات التي تم إجراؤها ، كانت هذه السلالات عبارة عن عصيات بكتيرية موجبة الجرام. الجزء الثاني يتعلق بتقدير إنتاج المواد الحيوية في الأوساط الأربعة ، قشور البطاطس ، ثفل الزيتون ، مكونات البلوط الأخضر والجلوكوز الذي أعقبه ثلاثة اختبارات خلال عملية التخمر: مؤشر الاستحلاب ، اختبار إزاحة الزيت وجرعة السكريات المختزلة. أظهرت نتائج اختبار الاستحلاب هذه النتائج للسلالة 1 والسلالة 02 على التوالي بعد 120 ساعة $273.25 \pm 0.3\%$ و $90.69 \pm 0.3\%$ لوسط غشاء هولم البلوط. $47.93 \pm 0.1\%$ و $65.25 \pm 0.5\%$ لقشور البطاطس ؛ $68.3 \pm 0.1\%$ و $70.2 \pm 0.3\%$ للجلوكوز و 63.33 ± 1.7 و 58.96 ± 1.4 لثفل الزيتون ولنتائج الإزاحة أظهرت أن قطر الهالة للسلالة 01 والسلالة 02 هو 1.95 ± 0.01 سم و 1.4 ± 0.1 سم للثفل الجلوكوز و 2.7 ± 0.1 سم و 1.75 ± 0.09 سم لمقشرات البطاطس ؛ 1.75 ± 0.1 سم و 1.9 ± 0.1 سم لثفل الزيتون و 1.4 ± 0.04 سم و 1.8 ± 0.02 سم. تم تحديد محصول المواد الحيوية التي تنتجها السلالتان مقابل الوسائط المختلفة المستخدمة بعد الترسيب الحمضي واستخلاص المذيبات. تم الحصول على أعلى محصول في الوسط المعتمد على قشور البطاطس بمعدل $113.370.07$ للسلالة 1 و 100.75 ± 0.05 للسلالة 2.

الكلمات المفتاحية: المواد الحيوية ، المنتجات الغذائية الثانوية ، مؤشر الاستحلاب ، اختبار إزاحة الزيت ، جرعة السكريات المختزلة