

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université A. MIRA-BEJAIA



جامعة بجاية  
Tasdawit n Bgayet  
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Physico-Chimique  
Laboratoire de Biochimie Appliquée

**THÈSE**  
**EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE**  
**DOCTORAT**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie. Filière : Sciences Biologiques**  
**Spécialité : Biochimie Appliquée**

**Présentée par**  
**DJAFRI-DIB Salima**

*Thème*

**Détermination des profils physicochimiques et biologiques  
de biosurfactant BLA produit par *Alcaligenes aquatilis*  
YGD 2906 et optimisation des conditions de sa production**

**Soutenue le : 02/10/2025**

**Devant le Jury composé de :**

**Nom et Prénom**

**Grade**

**M<sup>r</sup> BETTACHE Azzeddine**  
**M<sup>r</sup> OUCHEMOUKH Salim**  
**M<sup>me</sup> YALAOUI-GUELLAL Drifa**  
**M<sup>me</sup> BAZIZI-CHAHER Nassima**  
**M<sup>r</sup> KADRI Nabil**  
**M<sup>r</sup> TACHERFIOUT Mustapha**

|            |                 |               |
|------------|-----------------|---------------|
| Professeur | Univ. de Bejaia | Président     |
| Professeur | Univ. de Bejaia | Rapporteur    |
| MCA        | Univ. de Bouira | Co-rapporteur |
| Professeur | Univ. de Bejaia | Examinatrice  |
| Professeur | Univ. De Bouira | Examineur     |
| MCA        | Univ. de Bejaia | Examineur     |

**Année Universitaire : 2025 / 2026**

# *Remerciements*

# Remerciements

*Ce travail est le fruit d'investigation au sein du laboratoire de Biochimie Appliquée de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Bejaia, sous l'encadrement du professeur OUCHEMOUKH Salim et le co-encadreur docteur YALAOUI-GUELLAL Drifa, Maître de conférences A à l'université de Bouira.*

*Tout d'abord, je remercie le Bon Dieu de m'avoir donné la force, la patience et le courage d'achever ce travail.*

*Je tiens à remercier Mr OUCHEMOUKH Salim, Professeur à l'université de Bejaia, qui a accepté de superviser ce travail, pour ses conseils, sa disponibilité, ses encouragements tout au long de ce travail, sa confiance et la liberté qu'il m'a accordée. Son encadrement m'a permis d'évoluer, de progresser et de m'épanouir scientifiquement, cela a été un réel plaisir de travailler à ses côtés.*

*Je tiens tout particulièrement à remercier mon co-encadreur Mme YALAOUI-GUELLAL Drifa Maître de conférences A à l'université de Bouira, de m'avoir accompagnée pendant ces années de travail, pour la confiance qu'elle a placée en moi, pour ses nombreux conseils et surtout pour sa patience à toute épreuve. Un grand merci pour m'avoir constamment conseillé tant sur le plan scientifique que personnel, d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même.*

*Je tiens à présenter mes considérations et remerciements aux membres du jury : Mr BETTACHE Azzeddine, Professeur à l'université de Bejaia, qui m'a fait l'honneur de présider ce jury ; Mr KADRI Nabil, Professeur à l'université de Bouira, Mr TACHERFIOUT Mustapha, Maître de conférences A à l'université de Bejaia et Mme BAZIZI-CHAHAR Nassima, Professeur à l'université de*

*Bejaia, qui ont accepté de faire partie de ce jury, d'examiner ce travail et de consacrer de leur temps précieux pour l'évaluation de ce travail.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude au Professeur AMESSIS-OUCHEMOUKH Nadia pour son aide, ses conseils et ses encouragements constructifs qui ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.*

*Je tiens à remercier Mme BAZIZI-CHAHHER Nassima, Maître de conférences A à l'université de Bejaia, la directrice de laboratoire de Biochimie Appliquée de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Bejaia, pour m'avoir accueilli et permis de réaliser mes tests au sein de son laboratoire.*

*Je voudrais remercier le professeur Mr MADANI Khodir, Professeur à l'université de Bejaia, pour ses conseils méthodologiques et instrumentaux qui m'ont permis à la fois de mener à bien mes travaux et d'élargir mes connaissances scientifiques.*

*Je tiens à remercier le professeur Mme BOULKEBACHE-MAKHLOUF Lila la directrice du laboratoire de Biomathématique, Biophysique, Biochimie et de Scientométrie (3BS) de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Bejaia, pour m'avoir accueilli et permis de réaliser quelques tests au sein de son laboratoire. Merci pour toutes les discussions fructueuses et pour vos conseils qui m'ont aidé de bien tracé mon chemin.*

*Je tiens à remercier Mme ARKOUB-DJERMOUNE Lynda, Maître de conférences A à l'université de Bejaia, pour son aide, ses conseils et surtout son soutien psychologique.*

*Merci aussi à mon mari Brahim qui a tenu bon jusqu'au bout. Il est resté à mes côtés, m'a motivé, soutenu, écouté et encouragé.*

*Je n'aurais pas pu mener cette thèse jusqu'au bout sans le soutien de ceux qui me sont le plus proche. J'adresse donc mes derniers (et forcément les meilleurs !) remerciements à mes parents, ma famille et surtout mes enfants.*

*Je remercier mes amies et collègues pour leur soutien non seulement tout au long de la thèse mais aussi depuis de nombreuses années : Habiba, Naima, Samira, Lila, Nadia, Nadia, Ahlem, Lydia, Souhila, Katia, Habiba, Nawal et Youcef. Merci pour leur présence, leur aide, leur compréhension et leur amour.*

*Je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail et qui m'ont appris une infinité de choses et m'ont aidé, conseillé et soutenu de manière continue afin de mener ce travail dans les meilleures conditions.*

# *Dédicaces*

# Dédicaces

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que : Je dédie ce travail à :*

*A Mon très cher Père : Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.*

*A Ma tendre Mère : Tu représentes pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.*

*A mon très cher mari BRAHIM : Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel m'ont permis de réussir mes études. Que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance et de mon amour sincère et fidèle.*

*A mes très chères enfants : Ryma, Zahra, Meriem et Youcef*

*A mon unique frère : Mourad et sa femme Hanane et leurs fils Iliane.*

*A mes très chères sœurs : Dalida et Kahina et leurs maris anis qu'à leurs enfant Samy, Arinas et surtout Aris.*

*A la mémoire de mes chers beaux-parents.*

*A mes chères belles sœurs, mes chers beaux-frères.*

*A ma très chère copine Drifa.*

*A tous mes collègues de la faculté SNV.*

# *Table des matières*

## Table des matières

|                             |            |
|-----------------------------|------------|
| Liste des figures .....     | <i>i</i>   |
| Liste des tableaux .....    | <i>ii</i>  |
| Liste des abréviations..... | <i>iii</i> |
| Introduction .....          | <b>1</b>   |

## Partie 1 : Synthèse bibliographique

### Chapitre I: Généralités sur les biosurfactants

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| I. Définition des surfactants .....                        | 4  |
| II. Définition des biosurfactants .....                    | 4  |
| III. Structure .....                                       | 4  |
| IV. Différents types .....                                 | 5  |
| V. Classification .....                                    | 5  |
| V.1. Biosurfactants de bas poids moléculaire.....          | 6  |
| V.1.1. Glycolipides .....                                  | 7  |
| V.1.2. Lipopeptides.....                                   | 10 |
| V.1.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres..... | 13 |
| V.2. Biosurfactants de haut poids moléculaire .....        | 14 |
| V.2.1. Biosurfactant polymère .....                        | 14 |
| V.2.2. Biosurfactant particulaire .....                    | 14 |
| VI. Avantages et inconvénients.....                        | 15 |
| VII. Rôles des biosurfactants pour les bactéries .....     | 16 |
| VIII. Caractéristiques .....                               | 16 |
| VIII.1. Tension superficielle.....                         | 16 |
| VIII.2. Formation de micelles.....                         | 17 |

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| VIII.3. Activité émulsifiante.....                     | 17 |
| VIII.4. Tolérance au pH et à la température .....      | 17 |
| VIII.5. Faible toxicité et haute biodégradabilité..... | 18 |
| VIII.6. Formation de biofilm .....                     | 18 |
| IX. Propriétés antioxydantes .....                     | 18 |

## **Chapitre II: Production et caractérisation**

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| I. Production.....                                            | 19 |
| II. Microorganismes producteurs .....                         | 19 |
| III. Mécanismes de production.....                            | 20 |
| IV. Facteurs influençant la production .....                  | 21 |
| IV.1. Facteurs nutritionnels .....                            | 22 |
| IV.1.1. Source de carbone.....                                | 22 |
| IV.1.2. Source d'azote .....                                  | 22 |
| IV.1.3. Minéraux.....                                         | 22 |
| IV.2. Facteurs physico-chimiques .....                        | 23 |
| IV.2.1. pH .....                                              | 23 |
| IV.2.2. Température .....                                     | 23 |
| IV.2.3. Aération et Agitation .....                           | 23 |
| V. Extraction .....                                           | 23 |
| V.1. Séparation par précipitation.....                        | 24 |
| V.2. Séparation et extraction par solvant.....                | 24 |
| VI. Différentes techniques de caractérisation.....            | 24 |
| VI.1. Chromatographie sur couche mince .....                  | 25 |
| VI.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ..... | 25 |

## **Chapitre III: Applications des biosurfactants**

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| I. Industrie pétrolière .....                     | 26 |
| II. Industries pharmaceutique et médicinale ..... | 27 |
| III. Industrie alimentaire .....                  | 31 |
| IV. Industrie des détergents .....                | 31 |
| V. Agriculture.....                               | 32 |
| VI. Nanotechnologie .....                         | 33 |
| VII. Cosmétique .....                             | 33 |
| VIII. Bioremédiation .....                        | 33 |

## **Partie 2 : Partie expérimentale**

### **Chapitre I: Matériel et méthodes**

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| I. Origine de biosurfactant étudié (BLA 2906) .....           | 35 |
| II. Production de biosurfactant BLA 2906 .....                | 36 |
| III. Capacité de production.....                              | 37 |
| III.1. Test hémolitique .....                                 | 37 |
| III.2. Mesure de l'indice d'émulsion ( $E_{24}$ ).....        | 37 |
| III.3. Test de déplacement de l'huile .....                   | 38 |
| III.4. Test d'effondrement de la goutte .....                 | 38 |
| IV. Extraction et récupération de biosurfactant BLA 2906..... | 38 |
| V. Mesure du poids sec .....                                  | 38 |
| VI. Détermination du profil biochimiques .....                | 39 |
| VI.1. Détermination des protéines .....                       | 39 |
| VI.2. Détermination des glucides .....                        | 39 |
| VI.3. Détermination des lipides .....                         | 39 |

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| VI.4. Analyse spectrale UV .....                                  | 40 |
| VI.5. Analyse par CCM.....                                        | 40 |
| VI.6. Analyse par FTIR .....                                      | 41 |
| VI.7. Analyse par MALDI-TOF-MS .....                              | 41 |
| VI.8. Analyse de biosurfactant BLA 2906 par HPLC-MS/MS.....       | 42 |
| VII. Etude de la stabilité.....                                   | 42 |
| VIII. Propriétés biologiques .....                                | 43 |
| VIII.1. Détermination des activités antimicrobiennes .....        | 43 |
| VIII.1.1. Préparation des dilutions de biosurfactants.....        | 44 |
| VIII.1.2. Détermination de l'activité antibactérienne .....       | 44 |
| VIII.1.3. Détermination de l'activité antifongique .....          | 44 |
| IX. Activité anti-inflammatoire .....                             | 44 |
| X. Détermination de l'activité antioxydante.....                  | 45 |
| X.1. Pouvoir réducteur .....                                      | 45 |
| X.2. Test au phosphomolybdate.....                                | 46 |
| X.3. Activité scavenger au radical DPPH' .....                    | 46 |
| X.4. Activité scavenger au radical ABTS' .....                    | 47 |
| XI. Activité de biosorption des métaux lourds.....                | 49 |
| XII. Optimisation de la production de biosurfactant BLA 2906..... | 49 |
| XII.1. Conception de Plackett-Burman .....                        | 50 |
| XII.2. Méthodologie de surface de réponse (RSM).....              | 53 |
| XIII. Analyses statistiques.....                                  | 56 |

## Chapitre II: Résultats et discussions

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| I. Capacité de production de biosurfactant .....                       | 57 |
| I.1. Activité hémolytique .....                                        | 57 |
| I.2. Activité émulsifiante (E <sub>24</sub> ) .....                    | 58 |
| I.3. Déplacement d'huile .....                                         | 59 |
| I.4. Effondrement de la goutte .....                                   | 59 |
| II. Poids sec .....                                                    | 60 |
| III. Profils biochimiques.....                                         | 60 |
| III.1. Teneurs en protéines, sucres et lipides .....                   | 60 |
| III.2. Spectre UV .....                                                | 61 |
| III.3. Chromatographie sur couche mince .....                          | 62 |
| III.4. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR).....   | 63 |
| III.5. Caractérisation de biosurfactant BLA 2906 par MALDI-TOF-MS..... | 64 |
| III.5. Caractérisation de biosurfactant BLA 2906 par HPLC-MS/MS.....   | 66 |
| IV. Paramètres de stabilité.....                                       | 69 |
| IV.1. Effet de la température .....                                    | 70 |
| IV.2. Effet du pH .....                                                | 71 |
| IV.3. Effet du NaCl.....                                               | 72 |
| V. Activités biologiques.....                                          | 73 |
| V.1. Activité antimicrobienne .....                                    | 73 |
| V.2 Activité anti-inflammatoire .....                                  | 75 |
| V.3. Activités antioxydantes.....                                      | 76 |
| V.3.1. Pouvoir réducteur .....                                         | 76 |
| V.3.2. Activité au phosphomolybdate.....                               | 77 |

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| V.3.3. Activité scavenger au radical DPPH• .....                                            | 78 |
| V.3.4. Activité scavenger au radical ABTS• .....                                            | 78 |
| VI. Activité de biosorption des métaux lourds.....                                          | 79 |
| VII. Criblage des facteurs par Plackett- Burman Design .....                                | 80 |
| VIII. Optimisation des composants du milieu par la méthodologie de surface de réponse ..... | 84 |
| VIII.1. Équation de régression RSM et analyse du modèle.....                                | 87 |
| VIII.2. Courbes de surface de réponse pour la production de biosurfactants.....             | 91 |
| VIII.3. Validation du modèle.....                                                           | 94 |
| <b>Conclusion et perspectives</b> .....                                                     | 95 |
| <b>Références bibliographiques</b> .....                                                    | 97 |
| <b>Annexes</b>                                                                              |    |

## *Liste des figures*

## Liste des figures

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1:</b> Structure chimique des sophorolipides .....                                    | 7  |
| <b>Figure 2:</b> Structure chimique des trialolipides .....                                     | 8  |
| <b>Figure 3:</b> Structures des lipides de succinoyl tréhalose .....                            | 8  |
| <b>Figure 4:</b> Structure chimique des lipides de mannosylérythritol .....                     | 9  |
| <b>Figure 5:</b> Structure chimique des surfactines .....                                       | 11 |
| <b>Figure 6:</b> Structure chimique des fengycines .....                                        | 11 |
| <b>Figure 7:</b> Structure chimique des iturines .....                                          | 12 |
| <b>Figure 8:</b> Structure chimique des lichenycines .....                                      | 13 |
| <b>Figure 9:</b> Structure chimique des biosurfactant polymère .....                            | 14 |
| <b>Figure 10:</b> Structure chimique des biosurfactant particulaire .....                       | 15 |
| <b>Figure 11:</b> Synthèse de précurseurs de biosurfactant en utilisant des hydrocarbures ..... | 21 |
| <b>Figure 12:</b> Dépollution des hydrocarbures par des biosurfactants .....                    | 27 |
| <b>Figure 13:</b> Interactions entre les biosurfactant et les cellules bactériennes. ....       | 29 |
| <b>Figure 14:</b> Mécanismes anti- biofilms des biosurfactants. ....                            | 30 |
| <b>Figure 15:</b> Elimination des métaux toxiques par des biosurfactants .....                  | 34 |
| <b>Figure 16:</b> Photographies de la souche <i>Alcaligenes aquatilis</i> . ....                | 35 |
| <b>Figure 17 :</b> Schéma du procès de production de biosurfactant BLA 2906 .....               | 36 |
| <b>Figure 18:</b> Mécanisme entre l'espèce radicalaire DPPH• et un antioxydant . ....           | 47 |
| <b>Figure 19:</b> Formation et piégeage du radical ABTS•+ par un antioxydant donneur de H•..... | 48 |
| <b>Figure 20:</b> Activité hémolytique négative de biosurfactant BLA 2906. ....                 | 57 |
| <b>Figure 21:</b> Photographie du test d'émulsification (E <sub>24</sub> ) .....                | 58 |
| <b>Figure 22:</b> Diamètre de déplacement du pétrole brut. ....                                 | 59 |
| <b>Figure 23:</b> Photographie du test d'effondrement de goutte. ....                           | 60 |
| <b>Figure 24:</b> Spectre UV- visible de biosurfactant.....                                     | 61 |
| <b>Figure 25:</b> Séparation de biosurfactant BLA 2906 sur CCM. ....                            | 62 |
| <b>Figure 26:</b> Spectre FTIR de biosurfactant BLA 2906. ....                                  | 63 |
| <b>Figure 27:</b> Spectre MALDI-TOF/MS du lipopeptide BLA 2906. ....                            | 65 |
| <b>Figure 28:</b> Spectre ESI-full MS du lipopeptide BLA 2906. ....                             | 67 |
| <b>Figure 29:</b> Chromatogramme d'un échantillon de lipopeptide BLA 2906. ....                 | 68 |
| <b>Figure 30:</b> Analyse par LC-MS/MS. ....                                                    | 68 |
| <b>Figure 31:</b> Structures de Fengycin A et Fengycin B. ....                                  | 69 |
| <b>Figure 32:</b> Stabilité thermique de biosurfactant BLA 2906 et SDS. ....                    | 70 |

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 33:</b> Effet du pH sur $E_{24}$ de biosurfactant BLA 2906 et SDS. ....                | 71 |
| <b>Figure 34:</b> Effet de NaCl sur $E_{24}$ de biosurfactant BLA 2906 et SDS. ....              | 72 |
| <b>Figure 35:</b> Activité antibactérienne du biosurfactant BLA 2906. ....                       | 73 |
| <b>Figure 36:</b> Activité antifongique du biosurfactant BLA. ....                               | 74 |
| <b>Figure 37:</b> Activité de biosorption des métaux lourds. ....                                | 79 |
| <b>Figure 38:</b> Production de BLA 2906 dépend des conditions de fermentation. ....             | 82 |
| <b>Figure 39:</b> Diagramme de Pareto des facteurs affectant la production de BLA 2906. ....     | 84 |
| <b>Figure 40:</b> Comparaison entre $E_{24}$ expérimentale et prédite par le modèle ajusté. .... | 90 |
| <b>Figure 41:</b> Courbes 3D et 2D illustrant l'optimisation de la production BLA 2906.....      | 91 |

## *Liste des tableaux*

## Liste des tableaux

|                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tableau I:</b> Les principaux biosurfactants produits par les micro-organismes .....                            | 5  |
| <b>Tableau II:</b> Production des biosurfactants par la valorisation des déchets .....                             | 20 |
| <b>Tableau III:</b> Différents microorganismes testés avec le biosurfactant étudié .....                           | 44 |
| <b>Tableau IV:</b> Niveaux de variables affectant la production de BLA 2906 .....                                  | 51 |
| <b>Tableau V:</b> Matrice de conception de Plackett-Burman .....                                                   | 51 |
| <b>Tableau VI:</b> Niveaux de variables testés dans RSM.....                                                       | 53 |
| <b>Tableau VII:</b> Exécutions des variables du plan composite central .....                                       | 54 |
| <b>Tableau VIII:</b> Paramètres de production du Biosurfactant BLA 2906.....                                       | 57 |
| <b>Tableau XI :</b> Activité antioxydante de Biosurfactant BLA 2906 .....                                          | 76 |
| <b>Tableau XII:</b> Matrice de conception de Plackett-Burman avec la repense d'activité d'muséification (E24)..... | 81 |
| <b>Tableau XIII:</b> Production BLA 2906 (E24) selon la conception Plackett-Burman .....                           | 82 |
| <b>Tableau XIV:</b> Exécutions des variables du plan composite central (CCD) avec la repense E24 .....             | 85 |
| <b>Tableau XV:</b> Analyse de variance du modèle quadratique de surface de réponse .....                           | 87 |
| <b>Tableau IX:</b> Identification des lipopeptides à l'aide de la spectrométrie MALDI-TOF/MS..                     | 65 |
| <b>Tableau X:</b> Identification des lipopeptides par chromatographie HPLC/MS .....                                | 66 |
| <b>Tableau XI :</b> Activité antioxydante de Biosurfactant BLA 2906 .....                                          | 76 |
| <b>Tableau XII:</b> Matrice de conception de Plackett-Burman avec la repense d'activité d'muséification (E24)..... | 81 |
| <b>Tableau XIII:</b> Production BLA 2906 (E24) selon la conception Plackett-Burman .....                           | 82 |
| <b>Tableau XIV:</b> Exécutions des variables du plan composite central (CCD) avec la repense E24 .....             | 85 |
| <b>Tableau XV:</b> Analyse de variance du modèle quadratique de surface de réponse .....                           | 87 |

## *Liste des abréviations*

## Liste des abréviations

**ANOVA** : Analyse of one variance

**Bios** : Biosurfactant

**CCD** : Conception Composite Centrale

**CCM** : Chromatographie Sur Couche Mince

**E<sub>24</sub>** : Activité D'emulsification

**FTIR** : Spectroscopie Infrarouge A Transformée De Fourier

**HPLC-MS/MS** : Chromatographie Liquide à Haute Performance couplée à la Spectrométrie de Masse

**IC<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice de 50 %

**ISM** : Milieu De Sel Inorganique

**MALDI-TOF-MS** : Spectrométrie de Masse à Temps de vol par Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice

**MEL** : Lipide De Mannosylérythritol

**MS** : Matière Sèche

**MSM** : Milieu Salé Minéral

**ODA** : Zone De Déplacement D'huile

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**PPM** : Partie Par Million

**R<sub>f</sub>** : Rapport Frontal

**RSM** : Méthodologie de Surface de Réponse

**SARM** : *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Methicilline

**SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate

**SE** : Erreur Standard

**TSH** : Tryptone-Soja-Sang De Cheval

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UV** : Ultra-Violet

# *Introduction*

## **Introduction**

Les tensioactifs naturels communément appelés biosurfactants sont des molécules structurellement diversifiées produites par une grande variété de micro-organismes (bactéries, levures et moisissures). Ils sont soit sécrétés à l'extérieur de la cellule ; soit liés à des parties de la cellule. En outre, ils sont cultivés dans différents substrats, solubles (glucides) ou insolubles (hydrocarbures, huiles et résidus huileux), et ils peuvent remplacer les tensioactifs synthétiques (Makkar et Rockne, 2003).

Les biosurfactants sont des molécules amphiphiles qui s'accumulent à l'interface des milieux polaires et apolaires. Ils réduisent les tensions superficielles et interfaciales des liquides en modifiant les propriétés de surface et d'interface et en augmentant la solubilité, la biodisponibilité, la biodégradabilité et la mobilité des molécules polaires dans les substances non polaires et vice versa (Aparna et al., 2011 ; Shavandi et al., 2011 ; Khaled et Aboul-Enein, 2015).

Parmi les différents biosurfactants recensés, il y a des phospholipides, des lipopeptides, des acides gras, des lipides neutres, des glycolipides et des composés polymères ou particuliers (Khopade et al., 2012).

D'une manière générale, ils présentent plusieurs avantages tels qu'un pouvoir moussant élevé, une faible toxicité, une stabilité dans des conditions environnementales extrêmes de température, de pH et de salinité et leur capacité de se produire sur des substrats peu coûteux et renouvelables, contrairement à leurs homologues synthétiques issus de l'industrie pétrolière (Pacwa-Płociniczak et al., 2011 ; Stella et al., 2023).

Ils peuvent améliorer le processus de bioremédiation en éliminant les contaminants d'hydrocarbures par les micro-organismes existants dans les environnements pollués et ils ont la capacité d'éliminer les métaux lourds (Khopade et al., 2012 ; Nikolova et Gutierrez, 2021 ; Lin et al., 2023).

Les biosurfactants sont applicables dans différents domaines grâce à leurs propriétés amphipathiques, comme l'agroalimentaire, l'agriculture, l'environnement et les industries textile, pétrolière et pharmaceutique. Ces molécules sont utilisées comme solubilisant, émulsifiants, dispersants, agents moussants et détergents (Poirier et al., 2023).

Néanmoins, en dépit de leurs propriétés remarquables, l'utilisation et la disponibilité commerciale des biosurfactants restent limitées et ils ne sont pas en mesure de concurrencer économiquement avec leurs homologues synthétiques en raison de leurs faibles rendements et de leurs coûts de production élevés, ce qui freinent jusqu'à présent leur succès commerciale (Santos et al., 2016 ; Sarubbo et al., 2022).

L'étude bibliographique montre que les biosurfactants sont peu étudiés en Algérie en comparant aux bactéries qui les produisent. Cependant, aucune recherche n'est menée sur l'étude des activités antioxydante et anti-inflammatoire, la capacité de biosorption des différents métaux lourds et la stabilité du biosurfactant BLA 2906 produit par la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906. Par conséquent, la présente étude vise à étudier ce biosurfactant synthétisé par la souche sélectionnée pour cette étude, ensuite d'extraire et de quantifier à l'aide de plusieurs techniques. Son profil chimique et ses propriétés biologiques sont analysés afin de mieux comprendre sa composition et ses fonctionnalités. Par ailleurs, différentes conditions de culture sont testées dans le but d'optimiser sa production en utilisant le plan d'expérience (Plackett-Burman) et la méthodologie de surface de réponse (RSM).

Les objectifs principaux de cette thèse sont les suivants :

1. L'extraction du biosurfactant BLA 2906, produit par la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906, ainsi que l'évaluation de sa production à l'aide de différentes méthodes analytiques.
2. L'analyse de ses profils chimique et biologique, accompagnée de sa caractérisation approfondie.
3. L'optimisation des conditions de production afin d'améliorer son rendement.

La thèse est structurée en deux grandes parties :

La première partie, d'ordre bibliographique, présente les notions fondamentales liées aux biosurfactants, notamment leur définition, leur mode de production, leurs méthodes de caractérisation, ainsi que leurs domaines d'application.

La seconde partie est consacrée aux travaux expérimentaux. Elle décrit en détail les protocoles utilisés, incluant l'évaluation de l'activité tensioactive (indice d'émulsification, test hémolytique, test de déplacement d'huile, stabilité, effondrement des gouttes), l'analyse chimique et biologique du biosurfactant, sa caractérisation par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse, ainsi que l'étude de son activité antimicrobienne et de sa capacité de

biosorption de divers métaux lourds (Cd, Cu, Fe, Pb, Zn). Enfin, cette partie traite de l'optimisation de la production du biosurfactant à l'aide du plan de criblage de Plackett-Burman et de la méthodologie de surface de réponse (RSM). Elle se conclut par la présentation et l'analyse des résultats obtenus.

## *Synthèse bibliographique*

*Chapitre I :*  
*Généralités sur les*  
*biosurfactants*

## **Chapitre I: Généralités sur les biosurfactants**

### **I. Définition des surfactants**

Les surfactants sont des tensioactifs. Le terme tensioactif a été inventé par [Antara Products](#) en 1950. Les tensioactifs sont généralement des composés organiques amphipathiques. Ils contiennent à la fois des groupes hydrophobes ou non polaires "queues" et des groupes hydrophiles ou polaires "têtes". Ces molécules amphiphiles s'assemblent en milieu aqueux produisant des micelles. Par conséquent, ils sont solubles dans les solvants organiques et dans l'eau ([Mishra et al., 2009](#)).

Les tensioactifs ioniques les plus couramment utilisés sont : le SDS (dodécylsulfate de sodium), le sel d'ammonium, l'éthylène, l'éthoxylate, les acides gras, les esters sulfonates ou sulfates, l'ester de sorbitan et les copolymères d'oxyde de propylène ([Satpute et al., 2018](#)).

### **II. Définition des biosurfactants**

Les biosurfactants sont des molécules qui possèdent les mêmes caractéristiques que les surfactants synthétiques mais ils sont issus de microorganismes comme les bactéries, les levures ou mêmes des mycètes. Ces êtres vivants produisent un type de biosurfactant selon leur genre ou même à leur espèce ([Dubeau, 2009](#)).

Les propriétés physicochimiques des surfactants et des biosurfactants ont montré une grande similitude dans la réduction de la tension interfaciale. Cependant, les avantages des biosurfactants tels qu'une plus grande biodégradabilité, une stabilité élevée à divers facteurs environnementaux tels que le pH, la température et la salinité, une spécificité plus élevée, une valeur de concentration micellaire critique plus faible et une toxicité moindre, ont attiré l'attention de diverses industries et ils ont fait du biosurfactant un matériau d'intérêt ([Naughton et al., 2019](#)).

### **III. Structure**

La structure des biosurfactants dépend de plusieurs paramètres comme le type de microbe et du substrat et les conditions de production. Généralement, la structure des biosurfactants comprend une fraction hydrophile composée d'acides aminés ou de peptides, d'anions ou de cations, ou de mono-, di- ou polysaccharides. La partie hydrophobe est souvent constituée d'acides gras saturés, insaturés ou hydroxylés et de peptides hydrophobes ([Banat, 1995](#)).

#### IV. Différents types

Les tensioactifs peuvent être classés en fonction de la charge sur la partie polaire :

\* Les tensioactifs anioniques et cationiques.

\* Les tensioactifs amphotères (zwitterioniques) qui ont des fragments chargés positivement et négativement dans la même molécule (Rhman et Gakpe, 2008).

#### V. Classification

Contrairement aux surfactants synthétiques qui sont classés en fonction des groupes polaires, les biosurfactants microbiens sont classés principalement en fonction de la composition chimique et du micro-organisme (Tableau I) qui les produit (Sachdev et Cameotra, 2013). En outre, les biosurfactants, sont classés en deux grandes catégories en fonction de leur poids moléculaire, les biosurfactants de faible poids moléculaire et les biosurfactants de haut poids moléculaire (Dell'Anno et al., 2018).

**Tableau I:** Les principaux biosurfactants produits par les micro-organismes (Ahamed et Prasad, 2021).

| Classe       | Type              | Source                             |
|--------------|-------------------|------------------------------------|
| Glycolipides | Rhamnolipides     | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      |
|              |                   | <i>Nocardia erythropolis</i>       |
|              |                   | <i>Arthobacter sp.</i>             |
|              |                   | <i>Pseudomonas putida</i>          |
|              |                   | <i>Serratia rubidaea</i>           |
|              |                   | <i>Burkholderia thailandensis</i>  |
|              | Lipides tréhalose | <i>Burkholderia Pseudomallei</i>   |
|              |                   | <i>Burkholderia Plantarii</i>      |
|              |                   | <i>Rhodococcus erythropolis</i>    |
|              |                   | <i>Rhodococcus wratislaviensis</i> |
|              |                   | <i>Mycobacterium sp.</i>           |
|              |                   | <i>Arthrobacter paraffineus</i>    |
|              |                   | <i>Torulopsis bombicola</i>        |
|              |                   | <i>Torulopsis Apicola</i>          |
|              | Sophorolipides    | <i>Torulopsis petrophilum</i>      |
|              |                   | <i>Candida bombicola</i>           |
|              |                   | <i>Candida apicola</i>             |
|              |                   | <i>Candida rugosa</i>              |
|              |                   | <i>Rhodotorula mucilaginoso</i>    |
|              |                   | <i>Rhodotorula bogoriensis</i>     |
|              |                   | <i>Pichia anomala</i>              |

| Suite du tableau I                                    |                                |                                     |
|-------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
|                                                       | Lipides mannosylérythritol     | <i>Candida antarctica</i>           |
|                                                       | Cellobiolipides                | <i>Ustilago zae</i>                 |
|                                                       |                                | <i>Ustilago maydis</i>              |
| <b>Lipopeptides et Lipoprotéines</b>                  | Surfactine                     | <i>Nocardiosis alba</i>             |
|                                                       |                                | <i>Bacillus subtilis</i>            |
|                                                       | Fengycine                      | <i>Bacillus subtilis</i>            |
|                                                       | Viscosine                      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>      |
|                                                       | Lichenysine                    | <i>Bacillus licheniformis</i>       |
|                                                       | Antibiotique TA                | <i>Myxococcus xanthus</i>           |
|                                                       | Serrawettine                   | <i>Serratia marcescens</i>          |
|                                                       | Subtilosine                    | <i>Bacillus subtilis</i>            |
|                                                       | Gramicidine                    | <i>Bacillus brevis</i>              |
|                                                       | Polymixine                     | <i>Paenibacillus polymyxa</i>       |
| <b>Phospholipides, acides gras et lipides neutres</b> | Acide spiculisporique          | <i>Penicillium piculisporem</i>     |
|                                                       | Acide corynomycolique          | <i>Corynebacterium lepus</i>        |
|                                                       | Phosphatindyl-éthanolamine     | <i>Acinetobacter sp.</i>            |
|                                                       |                                | <i>Rhodococcus rythropolis</i>      |
| <b>Surfactants polymériques</b>                       |                                | <i>Myxococcus sp.</i>               |
|                                                       | Alsane                         | <i>Acinetobacter radioresistens</i> |
|                                                       | Biodispersane                  | <i>Arethrobacter calcoaceticus</i>  |
|                                                       | Glucides-Proteine-lipide       | <i>Pseudomonas fluorescens</i>      |
|                                                       |                                | <i>Debaryomyces polymorphus</i>     |
|                                                       | Emulsane                       | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>  |
|                                                       | Liposane                       | <i>Candida lipolytica</i>           |
|                                                       |                                | <i>Yarrowia lipolytica</i>          |
|                                                       | Mannoprotéine                  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>     |
|                                                       |                                | <i>Kluyveromyces marxianus</i>      |
| <b>Biosurfactants particuliers</b>                    | Protéine PA                    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>       |
|                                                       | Vésicules                      | <i>Acinetobacter sp.</i>            |
|                                                       |                                | <i>Pseudomonas marginalis</i>       |
|                                                       | Cellules microbiennes entières | <i>Cyanobacteria sp.</i>            |

### V.1. Biosurfactants de bas poids moléculaire

Les biosurfactants ont un faible poids moléculaire (500 à 1000 kDa) et comprennent des glycolipides, des lipopeptides, des phospholipides et des acides gras. Le faible poids moléculaire permet leur utilisation efficace dans les études de bioremédiation des contaminants (Fenibo et al., 2019).

### V.1.1. Glycolipides

Les glycolipides sont les biosurfactants les plus étudiés. Ils sont composés de glucides (hydrophiles) et d'acides aliphatiques hydroxylés ou d'acides gras à longue chaîne (lipophiles) liés par une liaison ester ou éther (Sharma et Saharan, 2016b).

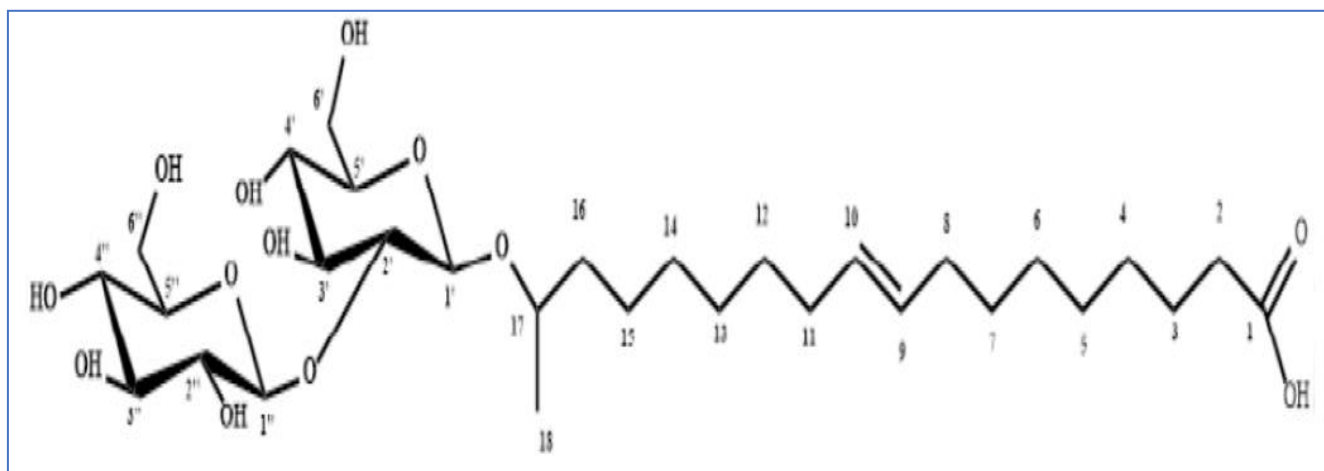
Les glycolipides se caractérisent par une grande diversité structurale et ils diminuent efficacement les tensions superficielle et interfaciale. La nature des hydrophiles (fraction glucidique) et des lipophiles catégorise les glycolipides en différentes sous-classes telles que : les rhamnolipides, les sophorolipides, les tréhalolipides, les succinoyl tréhalolipides, les lipides de cellobiose, les lipides de mannosylérythritol, les xylolipides, les lipides de mannosylribitol, les lipides de mannosylarabitol et les lipides d'oligosaccharides (Mnif et al., 2017).

#### ➤ Rhamnolipides

Les rhamnolipides contiennent un ou deux rhamnoses comme groupement glucidique lié à une ou deux chaînes d'acides gras  $\beta$ -hydroxylés (Chong et Li, 2017). Ils sont largement étudiés et ils sont produits par *Pseudomonas aeruginosa* (Rahman et al., 2002).

#### ➤ Sophorolipides

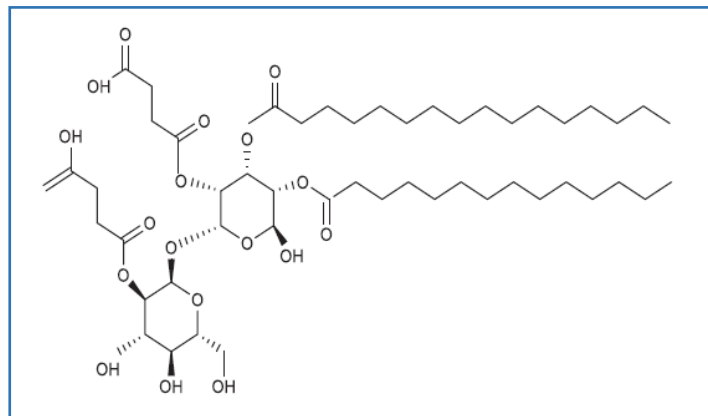
Les sophorolipides sont considérés comme l'une des classes les plus importantes de biosurfactants glycolipidiques. Ils sont constitués de sophorose, disaccharide constitué de deux glucose liées par liaison  $\beta(1-2)$  (Figure 1), attaché à un acide gras hydroxylé ( $C_{16}$  à  $C_{18}$ ) avec une longue chaîne (Mnif et al., 2018).



**Figure 1:** Structure chimique des sophorolipides (De Oliveira et al., 2015).

### ➤ Tréhalolipides

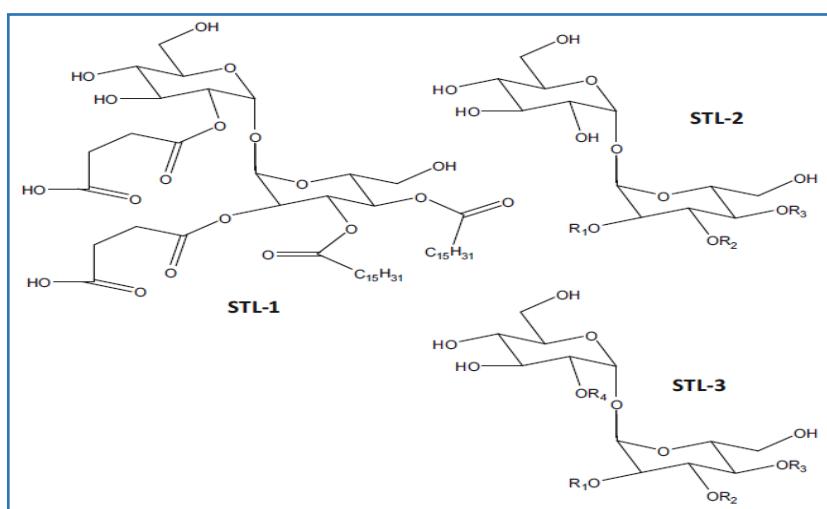
Les tréhalolipides sont composés de tréhalose et d'acides gras à longue chaîne reliées par une liaison ester (Figure 2). Le tréhalose, un glucide non réducteur, est composé de deux unités de glucose (Sharma et Saharan, 2016 b). Ils ont une capacité potentielle à diminuer la tension interfaciale et à augmenter la solubilité des composés hydrophobes (Franzetti et al., 2010).



**Figure 2:** Structure chimique des tréhalolipides (Mishra et al., 2021).

### ➤ Succinoyl tréhalolipides

Les lipides du succinoyl tréhalose sont principalement produits par les rhodocoques à partir de n-alcanes et sont constitués (Figure 3) d'un ou deux acides succiniques et de deux ou trois acides gras sur le noyau 1,10- $\alpha$ , - $\alpha$ -tréhalose (Jana et al., 2017). *Rhodococcus erythropolis* S67 et *R. erythropolis* SD-74 ont été étudiés pour produire des lipides de succinoyl tréhalose (Luong et al., 2018).



**Figure 3:** Structures des lipides de succinoyl tréhalose (STLs) (Jana et al., 2017).

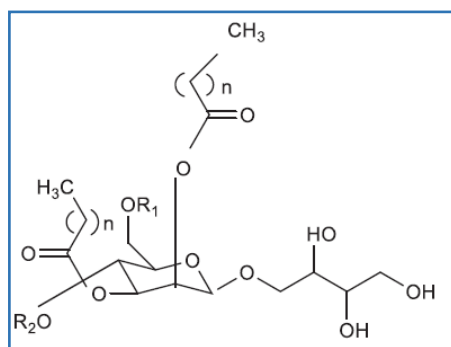
STL-2 : R1 - R3 = 1 x succionyle + 2 x alcanoyle ; STL-3 : R1- R4 = 1 x succionyle + 3 x alcanoyle

### ➤ **Lipides de cellobiose**

Les lipides de cellobiose sont constitués de résidu cellobiose et d'acide gras sous forme d'aglycone. Le cellobiose est constitué de combinaison de deux glucoses par une liaison  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (Kulakovskaya et al., 2014).

### ➤ **Lipides de mannosylérythritol**

Les lipides de mannosylérythritol (MEL) ont attiré l'attention des chercheurs en raison de ses propriétés physicochimiques et biochimiques remarquables et de son application dans divers domaines alimentaire, cosmétique et médical (Coelho et al., 2020). Les MEL (Figure 4) sont constitués de 4-O- $\beta$ -D-mannopyranosyl-mésoérythritol (hydrophiles), d'acide gras et/ou d'un groupe acétyle comme lipophiles et présentent une biodégradabilité facile, une bonne stabilité, une non-toxicité, une compatibilité avec l'environnement et une excellente activité émulsifiante (Coelho et al., 2020).



**Figure 4:** Structure chimique des lipides mannosylérythritol (Mishra et al., 2021).

### ➤ **Xylolipides**

Le xylolipide est un biosurfactant composé de xylose et d'acide  $\beta$ -hydroxydécanoïque (Sharma et al., 2015). Les xylolipides sont principalement produits par *Lactococcus lactis* et *Pichia caribbica* (Shu et al., 2019).

*Enterococcus faecium* a également montré le potentiel de produire le biosurfactant xylolipidique similaire dans ses caractéristiques à celui de différents biosurfactants produits par *Lactococcus* (Sharma et al., 2015).

### ➤ **Lipides de mannosylribitol et mannosylarabitol**

Le mono-mannophosphoinositide est dérivé du *Corynebacterium aquaticum*. L'activité de surface est attribuée à un lipopeptide contenant des acides corynomycoliques et plusieurs phospholipides (Hackett et Brennan, 1975).

### V.1.2. Lipopeptides

Les lipopeptides sont composés de chaînes d'acides gras attachées à un polypeptide (Sharma et al., 2016a). Les différents lipopeptides identifiés diffèrent principalement par la fraction peptidique, la longueur de la chaîne d'acides gras et la liaison entre les deux parties (Mnif et Ghribi, 2015). Les lipopeptides ont plusieurs propriétés tel que ; émulsifiantes, moussantes et hydratantes. Ils sont largement appliqués en industries agro-alimentaires, pharmaceutiques et cosmétiques (Kanlayavattanakul et Lourith, 2010).

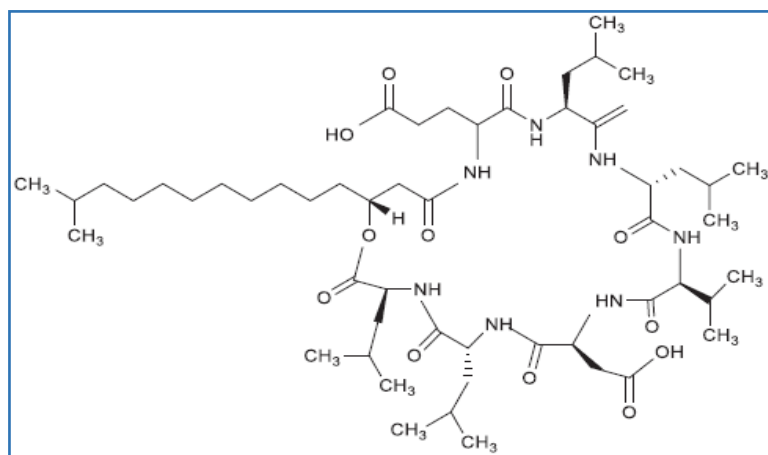
Les lipopeptides sont principalement produits par *Bacillus sp.* comme *Bacillus siamensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, .....etc (Chen et al., 2020). Certaines espèces de *Pseudomonas* sont également connues pour produire des lipopeptides (De Sousa et Bhosle, 2012). Ils sont classés sur la base de production par différentes souches comme suit : lipopeptides produits par *Bacillus*, lipopeptides produits par *Pseudomonas*, lipopeptides produits par actinomycètes et lipopeptides produits par les champignons (Mnif et Ghribi, 2015).

Généralement, les biosurfactants de type lipopeptide, exemple la surfactine, sont produits par la bactérie Gram positive, *Bacillus sp.* Un peptide boucle représente la fraction hydrophile de la surfactine tandis qu'une chaîne d'acides gras de 13 à 15 atomes de carbone représente la fraction hydrophobe. La boucle peptidique est composée de sept acides aminés successifs, à savoir l'acide L-aspartique, la L-leucine, l'acide glutamique, la L-leucine, la L-valine et deux D-leucines (Chen et al., 2015).

#### ➤ **Lipopeptides liés aux bacilles**

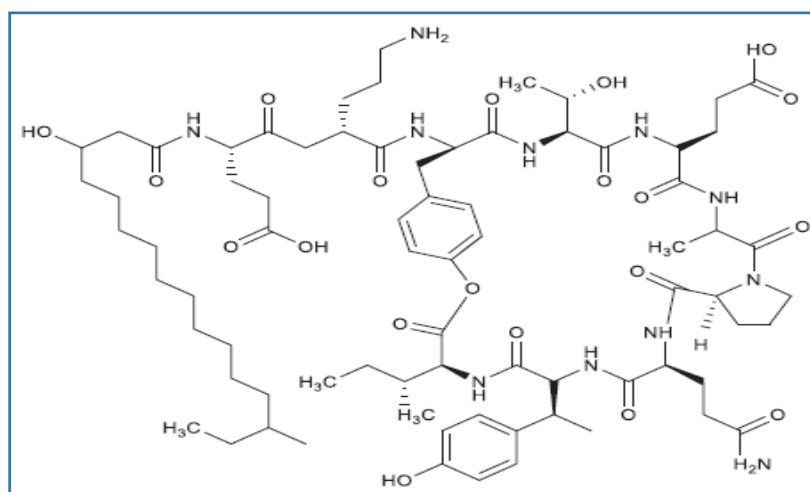
Les espèces de *Bacillus* produisent différents lipopeptides qui diffèrent principalement par la séquence et le type d'acides aminés, la cyclisation des peptides et le nombre d'atome de carbone des chaînes d'acides gras. Ils appartiennent principalement aux familles des surfactines, des iturines et des fengycines. Les fengycines et les surfactines sont des macrolactones, tandis que les iturines sont des cyclopeptides (Mnif et Ghribi, 2015). L'iturine et la fengycine présentent des activités antifongiques, tandis que la surfactine présente une puissante action antibactérienne (Meena et Kanwar, 2015).

**\*Surfactine** (~ 1,36 kDa) : la surfactine est composée de sept acides aminés (Figure 5) liés par une liaison lactone à une chaîne d'acides gras  $\beta$ -hydroxy (C13 à C16) qui forme une structure cyclique lactone fermée (Mnif et Ghribi, 2015).



**Figure 5:** Structure chimique des surfactines (Mishra et al., 2021).

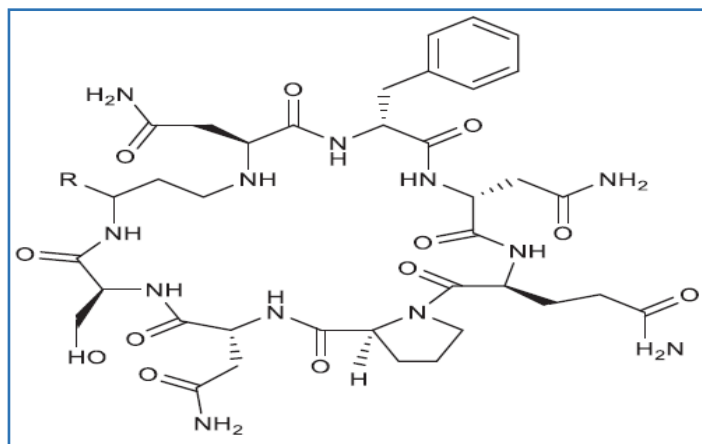
**\*Fengycine :** La fengycine est un décapeptide cyclique produit par plusieurs souches de *Bacillus subtilis*. Elle contient une chaîne peptidique de dix acides aminés liés à une chaîne d'acides gras (C14 à C17) (Meena et Kanwar, 2015). Sur dix acides aminés de la chaîne décapeptidique, huit acides aminés forment un cycle peptidique cyclique via une liaison lactone (Figure 6) (Pathak et al., 2012).



**Figure 6:** Structure chimique des fengycines (Mishra et al., 2021).

Différentes isoformes de fengycine se distinguent principalement au niveau de la sixième position du cycle peptidique et de la longueur des chaînes d'acides gras  $\beta$ -hydroxy (Pathak et al., 2012). La famille des fengycines est classée en divers sous-groupes, principalement la fengycine A, la fengycine B et la plipastatine A et B (Mnif et Ghribi, 2015). La présence d'Ala ou de Val en sixième position de la chaîne peptidique provoque la formation de fengycine A et de fengycine B, respectivement (Meena et Kanwar, 2015).

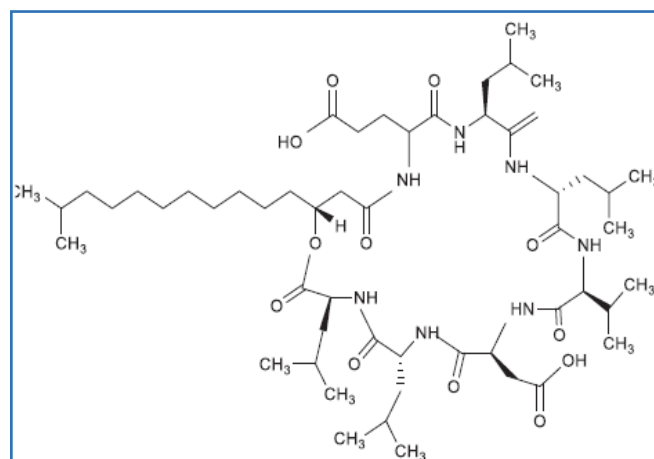
**\*Iturine** (~1,1 kDa) : L'iturine est un lipopeptide cyclique composé d'une chaîne peptidique de 7 acides aminés, reliée à une chaîne d'acides gras qui varie selon le nombre de molécules de carbone C-17 (Figure 7). En outre, ils sont classés en iturine A, C, D et E (Mnif et Ghribi, 2015). Parmi celles-ci, l'iturine A est largement synthétisée et elle présente une activité antifongique importante (Dang et al., 2019).



**Figure 7** : Structure chimique des iturines (Mishra et al., 2021).

**\*Kurstakins** : Les kurstakins sont isolés du *Bacillus thuringiensis* HD-1. Ils sont caractérisés par un faible poids moléculaire et les quatre kurstakines isolées diffèrent par la longueur de la chaîne d'acide gras (Hathout et al., 2000).

**\*Lichénycines** : *Bacillus licheniformis* produit les lichénycines (Figure 8), biosurfactants lipopeptides cycliques anioniques, qui abaissent la tension superficielle de l'eau à 27 mN/m (millinewton par mètre). Sur la base de variations spécifiques à l'espèce, ils sont nommés lichenycine A, B, C, D et G et surfactant BL86. La lichénycine élimine les biofilms de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Yersinia enterocolitica* résistants à la méthicilline (Coronel-León et al., 2015).



**Figure 8:** Structure chimique des lichenycines (Mishra et al., 2021).

➤ **Lipopeptides liés à *Pseudomonas***

Les lipopeptides cycliques sont produits par des synthétases peptidiques non ribosomiques. Contrairement aux espèces de *Bacillus*, les lipopeptides isolés des espèces de *Pseudomonas* présentent une large hétérogénéité structurale (Geudens et Martins, 2018).

➤ **Lipopeptides liés aux actinomycètes**

Les actinomycètes en particulier *Streptomyces* sp. tels que *Streptomyces canus* produisent divers antibiotiques lipopeptidiques par exemple la canumycin (antibiotique à large spectre) et tyrocidine, gramicidine S (antibactériens puissants, surtout contre les Gram-positifs) produit par *Streptomyces fradiae* (Schlusselhuber et al., 2018).

➤ **Lipopeptides liés aux champignons**

Les souches fongiques synthétisent des lipopeptides qui présentent des propriétés remarquables, notamment antimicrobiennes, antifongiques et anticancéreuses. Par exemples, les peptaibols sont une famille de peptides antimicrobiens produits par *Trichoderma* sp., *Beauveria bassiana* est un champignon entomopathogène qui produit la beauvericine, un lipopeptide de 10 acides aminés et des espèces du genre *Aspergillus* produisent des peptides cycliques qui possèdent des activités antifongiques et cytotoxiques (Mnif et Ghribi, 2015).

### V.1.3. Acides gras, phospholipides et lipides neutres

Diverses espèces bactériennes et de levures sont capables de se développer sur différents substrats comme les n-alcanes et produisent une énorme quantité d'acides gras, de lipides neutres et de phospholipides (Joy et al., 2017).

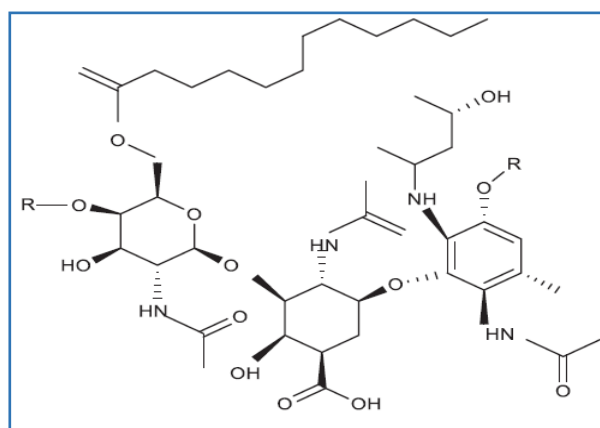
Les surfactants ioniques, comme la phosphatidyléthanolamine, isolés de *Rhodococcus erythropolis* ont montré des propriétés tensioactives proéminentes (Kretschmer et al., 1982). *Acinetobacter spp.* et *Rhodococcus erythropolis* produisent des vésicules de phosphatidyléthanolamine qui sont des microémulsions dans l'eau. Les phospholipides synthétisés par *Thiobacillus thiooxidans* sont responsables de la réduction du soufre élémentaire du sol (Campos et al., 2013).

## V.2. Biosurfactants de haut poids moléculaire

Les bio-tensioactifs de haut poids moléculaire (>1000 kDa) comprennent des polysaccharides polymères et des tensioactifs particuliers. Ils sont principalement utilisés comme agents stabilisants et émulsifiants dans les procédés industriels en raison de leur excellente activité émulsifiante. L'alsane et l'émulsane, produits à partir d'*Acinetobacter sp.*, sont des biosurfactants de poids moléculaire élevé (Varjani et Upasani, 2021).

### V.2.1. Biosurfactant polymère

Les biosurfactants polymères sont des tensioactifs produits par des micro-organismes, constitués de macromolécules telles que des polysaccharides, protéines ou glycoprotéines. Il y émulsane (*Acinetobacter calcoaceticus*), liposane (*Candida lipolytica*) et alasane (*Acinetobacter radioresistens*) (Figure 9) (Santos et al., 2016).

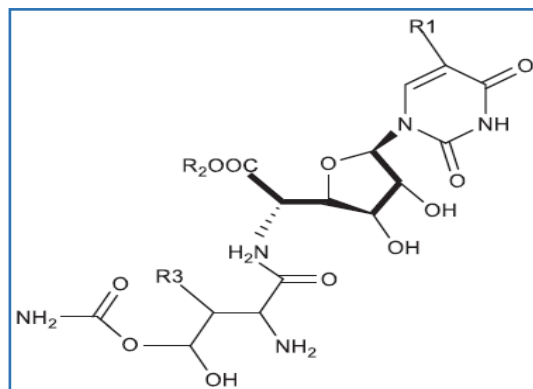


**Figure 9:** Structure chimique de biosurfactant polymère (émulsane) (Mishra et al., 2021).

### V.2.2. Biosurfactant particulière

Les biosurfactants particuliers sont des tensioactifs biologiques formés de particules volumineuses telles que vésicules, globules ou complexes macromoléculaires. Produits par certains micro-organismes, ces biosurfactants facilitent l'émulsification, la dispersion et la stabilisation des interfaces (Figure 10) (Vijayakumar et Saravanan, 2015).

Ils sont classés en deux classes, à savoir les vésicules extracellulaires et les cellules microbiennes entières. Les vésicules membranaires extracellulaires forment des microémulsions et provoquent l'absorption d'hydrocarbures par les cellules microbiennes (Vijayakumar et Saravanan, 2015).



**Figure 10:** Structure chimique de biosurfactant particulaire (mannoprotéine) (Mishra et al., 2021).

## VI. Avantages et inconvénients

Les biosurfactants possèdent plusieurs avantages et inconvénients :

### ✓ **Avantages**

- Biodégradables et écologiques : Se décomposent naturellement, limitant la pollution.
- Faible toxicité : Plus sûrs pour l'homme, les animaux et l'environnement que les tensioactifs chimiques.
- Efficaces à faibles concentrations : Réduisent efficacement la tension superficielle et stabilisent les émulsions même en petite quantité.
- Résistance aux conditions extrêmes : Fonctionnent bien sous variations de pH, de température et salinité.
- Multiples fonctions : Possèdent des propriétés antimicrobiennes, antiadhésives et émulsifiantes.
- Production à partir de matières renouvelables : Fabriqués par des micro-organismes utilisant des déchets organiques ou ressources naturelles.

### ✓ **Inconvénients**

- Coût de production élevé : La production industrielle des biosurfactants reste coûteuse comparée aux tensioactifs synthétiques, notamment à cause des milieux de culture, du temps de fermentation et des étapes de purification (Banat et al., 2010).

- Rendement variable : Le rendement en biosurfactants peut être faible et dépend fortement des conditions de culture (pH, température, nutriments).
- Stabilité limitée : Certains biosurfactants peuvent être sensibles à des conditions extrêmes (pH très acide ou basique, températures élevées) ce qui limite leur usage dans certains environnements industriels.
- Complexité structurale : Leur structure parfois complexe peut compliquer leur caractérisation, standardisation et formulation dans des produits finis.
- Disponibilité limitée : Les biosurfactants naturels ne sont pas encore produits à grande échelle pour toutes les applications, ce qui limite leur accès commercial (Banat et al., 2010).

## **VII. Rôles des biosurfactants pour les bactéries**

La fonction physiologique majeure du tensioactif est de favoriser la croissance des micro-organismes sur des substrats non solubles en diminuant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus accessible (Mata-Sandoval et al., 2000).

Toutefois, les biosurfactants peuvent jouer d'autres rôles tout aussi cruciaux que l'émulsification, tels que : l'adhésion sur des surfaces solides et la création de biofilms, le contrôle du niveau énergétique cellulaire, l'activité antibactérienne, la virulence de certaines bactéries ainsi que la capture des métaux lourds (Vandecasteele et Monot, 2008).

## **VIII. Caractéristiques**

### **VIII.1. Tension superficielle**

Les biosurfactants possèdent une forte capacité à abaisser la tension superficielle entre deux phases, qu'elles soient liquides ou solides. Cette propriété tensioactive remarquable les rend plus efficaces que de nombreux surfactants chimiques, car ils peuvent atteindre des réductions significatives de la tension superficielle à de très faibles concentrations (Joy et al., 2017).

Cette capacité à modifier les interfaces est essentielle pour favoriser la solubilisation, la dispersion et la mobilisation de composés hydrophobes, notamment les polluants organiques et les métaux lourds. Elle constitue ainsi un mécanisme clé dans les processus de bioremédiation, en facilitant l'accès des micro-organismes aux contaminants (Sarubbo et al., 2015).

## VIII.2. Formation de micelles

La capacité de réduction de l'activité de surface d'un tensioactif dépend de sa concentration spécifique, connue sous le nom de la concentration micellaire critique (CMC) (Shah et al., 2016). Il s'agit de la concentration minimale de surfactant microbien requise pour obtenir la réduction maximale de l'activité de surface et induire la formation de micelles (Silva et al., 2014).

La formation de micelles est un processus d'équilibre qui aboutit à la formation d'une nanostructure. Généralement, à des concentrations plus élevées, les tensioactifs s'agrègent pour former des micelles dans des solutions aqueuses. Ils s'auto-assemblent pour former des micelles via les interactions Van der Waals et hydrophobes. Les micelles jouent un rôle important dans la réduction de l'activité de surface, la promotion de l'émulsification et la stabilisation. De plus, elles favorisent sélectivement la mobilisation des contaminants environnementaux à une concentration supérieure à la CMC et la solubilisation des contaminants environnementaux à une concentration inférieure à la CMC (Ayed et al., 2015).

## VIII.3. Activité émulsifiante

Une émulsion est un système hétérogène contenant un liquide non miscible dispersé dans un autre liquide sous forme de petites gouttelettes. Les biosurfactants sont bien caractérisés en tant qu'émulsifiants et sont largement utilisés dans les processus d'émulsification dans les industries alimentaire, cosmétique et pharmaceutique (Markande et al., 2021). En outre, ils sont utilisés comme additifs pour éliminer les hydrocarbures et les substances pétrolières de l'environnement. Par exemple, la surfactine, un lipopeptide produit par *Bacillus subtilis*, a été utilisée avec succès pour favoriser la biodégradation du pétrole brut dans des sols contaminés, en augmentant la biodisponibilité des hydrocarbures pour les micro-organismes dégradateurs (Liu et al., 2018).

## VIII.4. Tolérance au pH et à la température

Les biosurfactants sont relativement stables et ne perdent pas leur activité biologique à différents températures et pH. Les glycolipides ne sont pas affectés par des températures élevées (121 °C) (Cameotra et Makkar, 2010). Les biosurfactants produits par la souche *Pseudozyma sp.* restent actifs à des valeurs de pH très alcalines de 8,0 à 12,0 et à des températures élevées de 60 à 80 °C (Sajna et al., 2013).

En plus, ils peuvent tolérer des concentrations de sel plus élevées allant jusqu'à 10 %, alors que la plupart des surfactants chimiques sont inactivés à des concentrations de sel supérieures à 2 % (Cheng et al., 2016).

#### **VIII.5. Faible toxicité et haute biodégradabilité**

Les biosurfactants sont considérés comme des composés respectueux de l'environnement par rapport aux tensioactifs chimiques en raison de leur plus faible toxicité (Chakraborty et Das, 2014). Le faible profil de toxicité des biosurfactants signifie qu'ils sont peu ou pas nocifs pour l'être humain, les animaux et l'environnement. Contrairement à de nombreux tensioactifs chimiques, qui peuvent provoquer des irritations cutanées, des allergies, ou polluer les milieux aquatiques, les biosurfactants sont souvent biodégradables, non irritants et non toxiques même à des concentrations élevées (Luna et al., 2016).

Cependant, lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations trop élevées, les biosurfactants peuvent devenir nocifs pour les micro-organismes. Cela peut freiner leur croissance et diminuer l'efficacité de la dégradation des polluants (Kaczorek et al., 2018).

#### **VIII.6. Formation de biofilm**

Les biosurfactants ont une propriété qui leur permet de créer un environnement propice à l'adhésion bactérienne (Geys et al., 2014). Les biofilms sont la matrice extracellulaire produite par la communauté microbienne (Nadell et al., 2015). L'adhésion des cellules bactériennes peut avoir lieu à la fois en phase stagnante et mobile. La production de biofilm est un processus complexe dans lequel se produit la transition de cellules flottant librement vers une communauté microbienne adhérente à la surface (Dang et Lovell, 2016).

### **IX. Propriétés antioxydantes**

Ces dernières années, les biosurfactants ont attiré une attention particulière en raison de leurs propriétés antioxydantes potentielles. Ces molécules sont capables d'inhiber la formation de molécules réactives de l'oxygène (ROS) et d'azote (RNS), deux familles de radicaux libres impliquées dans le stress oxydatif cellulaire. Le stress oxydatif, résultant d'un déséquilibre entre la production de ces espèces réactives et les défenses antioxydantes de l'organisme, est reconnu comme un facteur majeur dans la pathogenèse de nombreuses maladies chroniques, telles que les cancers, les affections cardiovasculaires et les maladies neurodégénératives. Ainsi, l'intégration de biosurfactants dotés d'une activité scavenger dans des formulations thérapeutiques ou préventives représente une voie prometteuse en matière de santé publique et de développement de produits bioactifs (Seifried et al., 2017).

*Chapitre II :*  
*Production et caractérisation*  
*des biosurfactants*

## Chapitre II: Production et caractérisation

### I. Production

Les biosurfactants sont produits par des microorganismes pendant leurs croissances dans des milieux avec des substrats insolubles dans l'eau. La production des biosurfactants à partir des déchets et des produits agricoles est l'objet de plusieurs étude et application des entreprises dans le but de baisser les coûts de production et de réduire les quantités de déchets à traiter (Cameotra et Makkar, 2004).

Le tableau II résume des matériaux peu coûteux exploités comme substrats pour la production des biosurfactants. La sélection des déchets devrait assurer un bon équilibre en nutriments pour permettre la croissance microbienne et la production de biosurfactants. Les déchets industriels à haute teneur en glucides ou en lipides sont bons pour être utilisés comme sources de carbone (Singh et al., 2018).

### II. Microorganismes producteurs

Les microorganismes se développent sur différents types de substrats car ils ont besoin d'une source de carbone pour se proliférer (Tableau II). Le mélange de substrat insoluble avec des sources de carbone facilite la production de différentes substances et la diffusion intracellulaire (Usman et al., 2016).

Les microbes (bactéries, champignons et levures) peuvent synthétiser des biosurfactants de structure moléculaire et de propriétés de surface variées (Singh et al., 2018).

Les scientifiques ont isolé des microbes qui synthétisent des molécules tensioactives avec des caractéristiques de surfactant souhaitées telles qu'une activité émulsifiante élevée, une faible valeur de la CMC et une légère toxicité (Sobrinho et al., 2013).

Les principaux producteurs de biosurfactants sont les genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (Loiseau et al., 2018).

**Tableau II:** Production des biosurfactants par la valorisation des déchets (Singh et al., 2018).

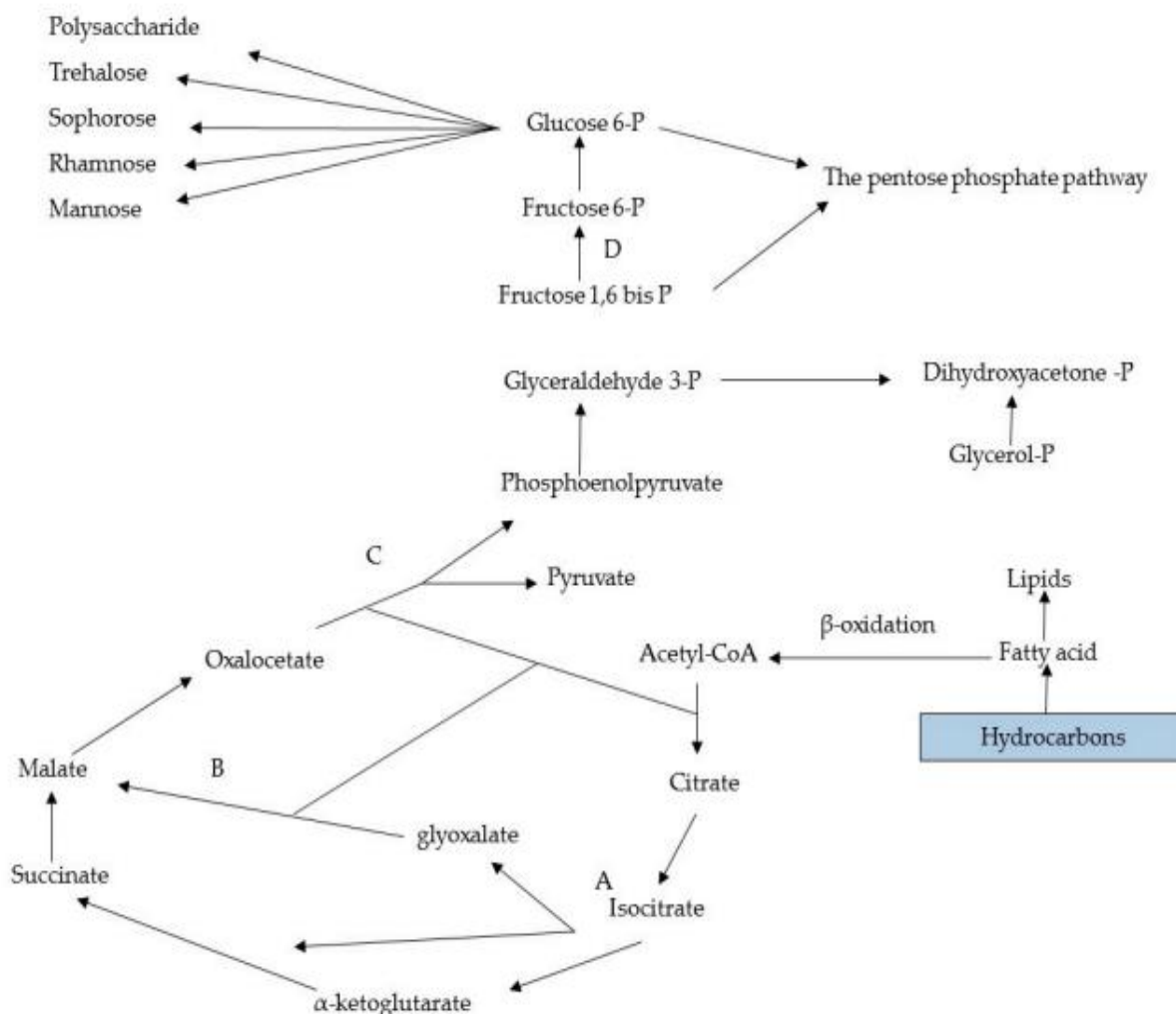
| Type d'industrie / déchets                                                                                                                                                                                                                                                | Type d'espèce microbienne                                                                                                                                                                   |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Résidus industriels et agroalimentaires :</b> Mélasse de dattes, bagasses de canne à sucre, écorces d'orange, farine d'écorce de sésame, résidus de thon, écorces de bananes, écorces de pommes de terre, liqueurs de maïs, gâteaux de cacahuètes, résidus de moringa. | <i>Halobacterium salinarum</i><br><i>Bacillus pumilis</i><br><i>Bacillus licheniformis</i><br><i>Cunninghamella haeospora</i><br><i>Candida tropicalis</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| <b>Déchets d'origine animale :</b> d'abattoir, graisses animales, et de transformation du poisson.                                                                                                                                                                        | <i>Pseudomonas gessardii</i><br><i>Nocardia higoensis</i>                                                                                                                                   |
| <b>Déchets d'origine agroalimentaires :</b> d'oliviers, effluents traités à la tannerie, déchets de l'industrie de l'huile de palme et de l'huile de soja.                                                                                                                | <i>Brachybacterium paraconglomeratum</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Bacillus pseudomycooides</i><br><i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Bacillus subtilis</i>                   |
| <b>Huile de cuisson-alimentaire :</b> huile de friture et de noix de coco.                                                                                                                                                                                                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br><i>Candida lipolytica</i>                                                                                                                                  |

### III. Mécanismes de production

La production de biosurfactants par divers microorganismes est particulièrement notable lors de leur croissance sur des substrats hydrophobes non miscibles à l'eau (Cameotra et Makkar, 1998). Ces microorganismes ont développé des systèmes enzymatiques et des mécanismes de régulation métabolique leur permettant d'exploiter efficacement deux voies métaboliques distinctes : la voie des hydrocarbures et celle des glucides, qui constituent respectivement des sources de carbone et d'énergie (Jemil et al., 2018).

Les substrats hydrophiles, notamment les glucides, sont principalement utilisés pour les besoins métaboliques cellulaires ainsi que pour la biosynthèse de la fraction polaire des biosurfactants. À l'inverse, les substrats hydrophobes sont mobilisés exclusivement pour la formation de la fraction hydrophobe, essentiellement composée d'hydrocarbures (Desai et Banat, 1997).

Cette double stratégie métabolique illustre une adaptation fine des microorganismes à la nature des substrats disponibles, optimisant ainsi la synthèse de biosurfactants aux propriétés physico-chimiques adaptées à leur environnement. La figure 11 illustre que le glucose 6-phosphate est le principal précurseur des polysaccharides et disaccharides formés pour la production de la fraction hydrophile des glycolipides (Santos et al., 2016).



**Figure 11 :** Synthèse de précurseurs de biosurfactant en utilisant des hydrocarbures.

Enzymes clés : A (isocitrate lyase) ; B (malate synthase) ; C (phosphoenolpyruvate) ; D (fructose 1,6 biphosphatase) (Santos et al., 2016).

#### IV. Facteurs influençant la production

La production microbienne de biosurfactant est affectée par plusieurs facteurs, notamment génétiques, physiologiques, nutritionnels et environnementaux. Ces biosurfactants peuvent atteindre des niveaux maximaux dans des conditions nutritionnelles et environnementales définies (Singh et al., 2018).

## IV.1. Facteurs nutritionnels

### IV.1.1. Source de carbone

Généralement, il y a trois catégories de sources de carbone : les groupes d'hydrocarbures, les lipides et les glucides (Nurfarahin et al., 2018). La majeure partie du coût de production du biosurfactant (30 à 40 %) provient uniquement du coût de préparation du milieu de production (George et Jayachandran, 2013).

La catégorie et la quantité de carbone dépendent de l'espèce microbienne et du type de biosurfactant. Plusieurs sources de carbone sont étudiées pour la production de biosurfactants, notamment des hydrophiles tels que le saccharose, le glycérol et le glucose, et des substrats hydrophobes, par exemple l'hexane, le pétrole brut, l'huile d'olive et l'huile de palme (Bhardwaj et al., 2013).

### IV.1.2. Source d'azote

L'azote est important dans le milieu de production du biosurfactant car il est essentiel à la croissance microbienne. Les composés azotés qui ont été utilisés largement pour la production de biosurfactants sont plusieurs tel que : peptone d'urée, extrait de levure, sulfate d'ammonium, et extrait de malt. L'extrait de levure est la source d'azote la plus utilisée, et sa concentration dépend de l'organisme et du milieu de culture. L'espèce *Arthrobacter paraffineus* préfère d'utiliser l'urée et les sels d'ammonium comme sources d'azote, alors que *Pseudomonas aeruginosa* utilise les nitrates (Md, 2012).

### IV.1.3. Minéraux

Les minéraux ont un effet positif sur la production de biosurfactants et/ou la croissance microbienne lorsqu'ils sont ajoutés au milieu de production en quantités infimes, généralement inférieures à 0,1 %. Pour la production de biosurfactants, de nombreux oligo-éléments sont utilisés : cobalt, cuivre, le molybdène et zinc (Nurfarahin et al., 2018).

Il est rapporté que le fer (Fe), le manganèse (Mn) et le magnésium (Mg) agissent comme cofacteurs pour la synthèse des enzymes responsables de la production de surfactine par *Bacillus subtilis* (Gudiña et al., 2015).

Les phosphates sont des facteurs importants pour l'activité et la croissance microbiennes car ils sont importants pour le stockage de l'énergie et les processus métaboliques (Nurfarahin et al., 2018).

De plus,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  sont généralement utilisés comme système tampon dans le milieu contenant le biosurfactant (Epstein et Vanag, 2003). En plus du phosphore (P), le calcium (Ca), le fer, le potassium (K) et le magnésium sont importants pour la formulation du milieu afin de faciliter le mécanisme de synthèse des protéines (Schobert, 1992).

## **IV.2. Facteurs physico-chimiques**

La quantité et les caractéristiques des biosurfactants sont très sensibles aux facteurs environnementaux. Les biosurfactants sont sensibles à différents facteurs (température, pH, aération, agitation, concentration en sels et le temps d'incubation) (Fenibo et al., 2019).

### **IV.2.1. pH**

La production de biosurfactant est influencée par le pH du milieu de culture (Amaral et al., 2006). La plupart des études sur les biosurfactants bactériens ont été menées à pH neutre ou presque neutre. Cependant, les levures et les champignons se développent dans des milieux acides (Morais et al., 2017). Le milieu acide ou basique est défavorable pour la production des biosurfactants chez *Pseudomonas aeruginosa* (Kosaric et Sukan, 2014).

### **IV.2.2. Température**

La croissance microbienne et la production de biosurfactants est également influencée par la température. Différents processus microbiens sont affectés même par un petit changement de température. La température la plus favorable pour la production de biosurfactants, par différents champignons, est de 30 °C (*Candida*, à savoir, *Candida sp. SY16*, *Candida bombicola*, *Candida batistae* et *Torulopsis bombicola*) (Santos et al., 2016).

### **IV.2.3. Aération et Agitation**

Les micro-organismes peuvent être aérobies, anaérobies ou anaérobies facultatifs, ce qui signifie que la quantité d'oxygène influence leur croissance, leur métabolisme et leur activité. L'aération et l'agitation du milieu de culture sont des facteurs très importants qui facilitent le transfert et la distribution de l'oxygène et, par la suite, influencent la production de biosurfactants (Roy, 2017).

## **V. Extraction**

L'extraction des biosurfactants du milieu de croissance nécessite différentes techniques. Il est primordial de faire la centrifugation pour séparer la biomasse bactérienne (Smyth et al., 2010). Deux techniques de séparation sont principalement utilisées :

### V.1. Séparation par précipitation

La plupart des chercheurs choisissent de faire la séparation par précipitation à pH acide, avec l'ajout d'acide chlorhydrique (pH 2), qui amène le biosurfactant à se charger positivement, réduisant l'efficacité de la région hydrophile et provoquant éventuellement une aggrégation (précipité qui est le biosurfactant) (Baker et Chen, 2010).

#### - Précipitation acide

La précipitation acide a été utilisée pour isoler les biosurfactants produits par différents micro-organismes. La plupart des méthodes utilisent une préconcentration par précipitation acide avant que des techniques plus sophistiquées ne soient appliquées (Baker et Chen, 2010). Cette extraction par précipitation permet de récupérer des substances à activité de surface et souvent utilisée pour le cas de surfactine synthétisée par *Bacillus subtilis* et la pseudosurfactine fabriquée par *Bacillus licheniformis*. Il est possible d'extraire les glycolipides comme précipités ou cristaux à partir du surnageant d'une culture de *Pseudomonas aeruginosa* par addition d'acide suivie d'une incubation à basse température.

### V.2. Séparation et extraction par solvant

Après centrifugation du bouillon de culture, un mélange de solvants, généralement un mélange chloroforme/méthanol (2 : 1, v/v), est ajouté au surnageant afin d'extraire les biosurfactants. Les solvants sont ensuite éliminés par évaporation, laissant un résidu correspondant au biosurfactant brut. Ce résidu est lyophilisé, puis pesé pour permettre sa quantification. Enfin, il est conservé dans des conditions appropriées jusqu'à son utilisation ultérieure (Pereira et al., 2013).

Récemment, les glycolipides produits par une population microbienne mixte et les rhamnolipides formés par *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida lipolytica* ont été isolés par acidification du surnageant de la culture puis une extraction aux solvants organiques.

## VI. Différentes techniques de caractérisation

La séparation et la caractérisation des biosurfactants est réalisée selon leur charge ionique, leur solubilité et leur localisation (intracellulaire, extracellulaire, ou lié aux cellules) selon plusieurs techniques : la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), la MALDI-TOF/MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight) couplé à un spectrophotomètre de masse, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Satpute et al., 2010).

La chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) ([Eddouaouda et al., 2012](#)).

### **VI.1. Chromatographie sur couche mince**

Il s'agit d'une méthode qualitative qui permet de confirmer la pureté du produit, utilisé pour l'analyse des composés des surnageants des milieux de cultures ([Slimani et al., 2018](#)).

Le solvant de la phase mobile s'écoule grâce à l'action capillaire. Les composants se déplacent selon leurs affinités vers l'adsorbant. Le composant ayant plus d'affinité pour la phase stationnaire se déplace plus lentement. Le composant ayant la moindre affinité pour la phase stationnaire se déplace plus rapidement. Ainsi, les composants sont séparés sur une plaque chromatographique ([Hussain et al., 2019](#)).

### **VI.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier**

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est utile pour l'analyse des groupes fonctionnels et les liaisons chimiques présentes dans l'échantillon afin de déterminer sa nature chimique ([Das et al., 2008 a](#)).

La présence ou l'absence de groupes fonctionnels, leurs états de protonation ou tout changement dû à de nouvelles interactions peuvent être surveillés en analysant la position et l'intensité de différentes bandes d'absorption IR ([Biniarz et al., 2017](#)).

*Chapitre III :*  
*Applications des*  
*biosurfactants*

### Chapitre III: Applications des biosurfactants

Les différents rôles des biosurfactants les rend applicables dans différents domaines : pétrochimiques, pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques. De plus, dans l'industrie, les tensioactifs sont utilisés comme émulsifiants, nettoyeurs, solubilisants et agents moussants, mouillants, et antimicrobiens (Gharaei-Fathabad, 2011 ; Aparna et al., 2012).

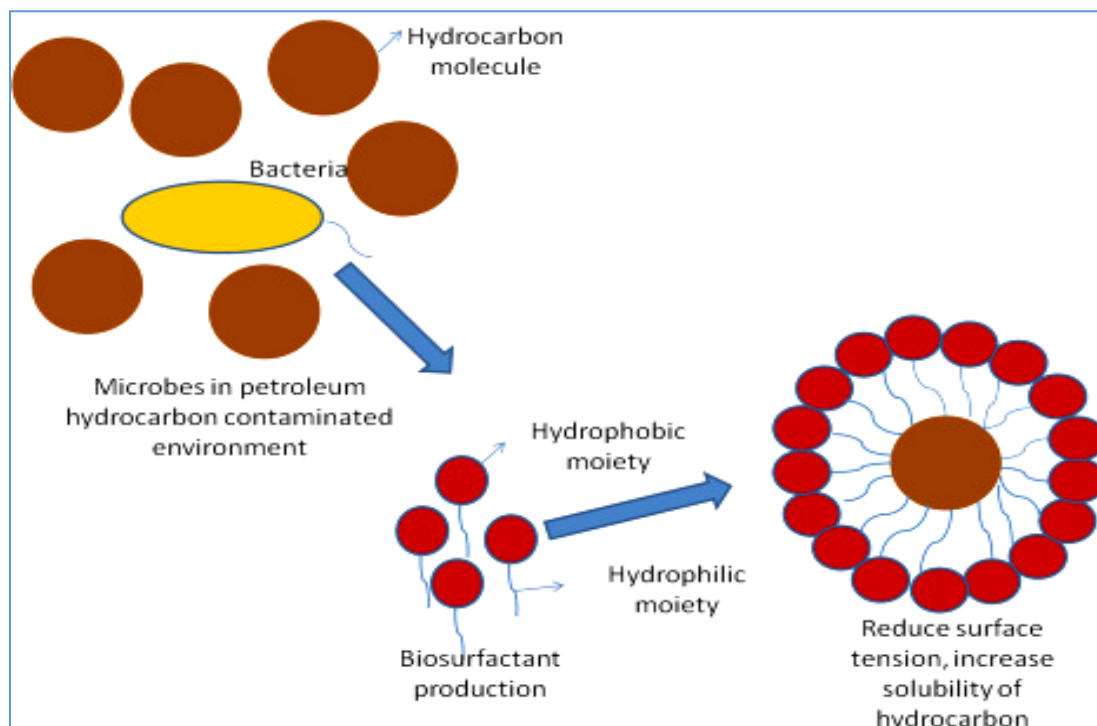
#### I. Industrie pétrolière

La dégradation de l'hydrocarbure est rendue possible par les biosurfactants. Ils améliorent le processus de récupération du pétrole par les microbes qui jouent un rôle important dans le nettoyage des conteneurs de pétrole/réservoirs de stockage et la formation de produits pétrochimiques (Perfumo et al., 2010).

La nature amphipathique des biosurfactants leur confère la capacité d'augmenter la solubilité des composés organiques et inorganiques en diminuant la tension superficielle aux interfaces liquide-liquide ou liquide-solide. Cette propriété rend les biosurfactants particulièrement efficaces pour la gestion et la remédiation des déversements de pétrole brut, constituant ainsi une solution prometteuse face aux enjeux environnementaux posés par les industries pétrolières à l'échelle mondiale (Patowary et al., 2017).

Le mécanisme probable de la dégradation des hydrocarbures implique une hydrophobicité améliorée de la surface des cellules bactériennes pour piéger les composés hydrophobes. L'émulsification des huiles ou des hydrocarbures (Figure 12) facilite leur transport et augmente leur biodisponibilité pour les microbes dégradant les hydrocarbures (Xu et al., 2018).

Divers biosurfactants sont testés pour éliminer les produits d'hydrocarbures de l'eau et du sol contaminés. *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.* et *Candida sp.* font partie des principaux producteurs de biosurfactants utilisés dans la dépollution des sols (Sachdev et Cameotra, 2013). Parmi tous les tensioactifs, le rhamnolipide est très efficace dans les processus de décontamination (Müller et al., 2012).



**Figure 12:** Dépollution des hydrocarbures par des biosurfactants (Dhanya, 2021).

L'ajout d'un biosurfactant produit par *Oceanobacillus sp.* augmente la biodégradation du pétrole brut jusqu'à 90 %. Le biosurfactant produit par *Bacillus brevis* a permis une dispersion et une émulsification efficaces de l'huile moteur dans l'eau, démontrant ainsi son potentiel pour la solubilisation de composés hydrophobes. La surfactine fait partie des différents surfactants utilisés dans les procédés de décontamination biotechnologique, avec des taux d'élimination supérieurs à 85 % avec les biomolécules produites par *B. licheniformis* et à 88 % avec celles produites par *B. subtilis*. D'autres biosurfactants produits par des espèces de *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Candida* ont également été utilisés avec succès dans la remédiation des sols. Le biosurfactant glycolipidique issu de *Pseudomonas aeruginosa* est capable d'éliminer les hydrocarbures des sols pollués. Ce biosurfactant s'est également révélé plus efficace que les tensioactifs chimiques testés (Sarubbo et al., 2022).

## II. Industries pharmaceutique et médicale

Les biosurfactants peuvent s'appliquer à l'administration, au mélange et à la formulation de médicaments (Ohadi et al., 2020). Ils sont utilisés dans les industries pharmaceutique et médicale pour diverses applications thérapeutiques en raison de leurs propriétés antimicrobiennes, antiadhésives et inhibitrices d'enzymes (Sarubbo et al., 2022).

Parmi les principaux domaines de recherche sur ces biomolécules en médecine et en pharmacie figurent les biosurfactants libérateurs de gènes, les médicaments, ainsi que leurs activités antivirales et antitumorales. Ces propriétés permettent des approches thérapeutiques alternatives pour la prévention et le traitement des maladies et des infections, ainsi que pour réduire l'adhérence des micro-organismes pathogènes. Les biosurfactants, tels que les glycolipides et les lipopeptides, peuvent endommager la membrane cellulaire, entraînant une lyse et l'apoptose qui en résulte, inhibant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses (Sarubbo et al., 2022).

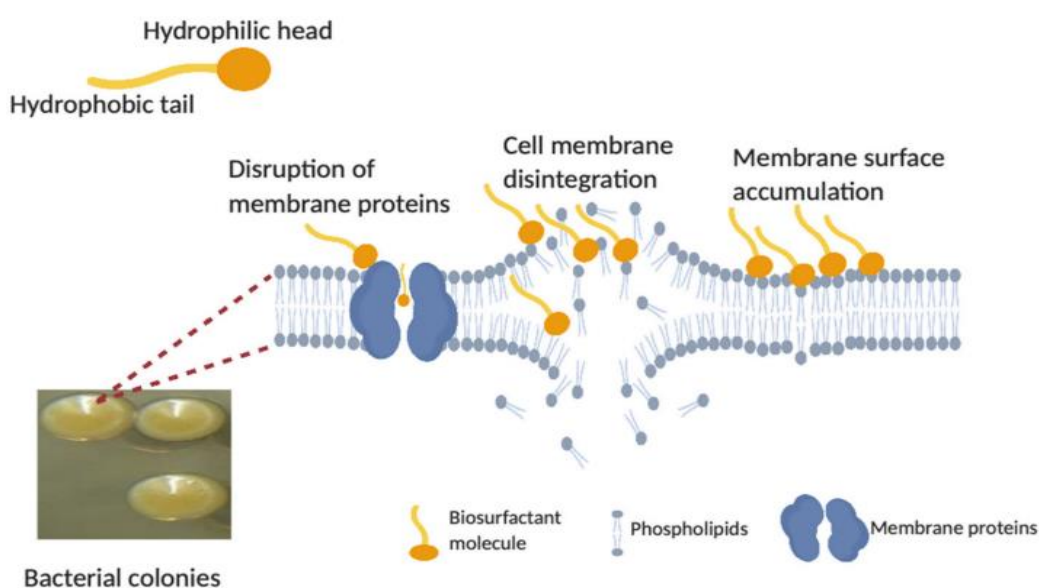
La surfactine présente des propriétés antimicrobiennes, antitumorales et antimycoplasmiques. Les lipopeptides auraient également des applications dans la cicatrisation des plaies grâce à leurs propriétés anti-radicalaires, contribuant à prévenir l'inflammation et améliorant la formation des tissus et la différenciation épidermique. Une autre application concerne la santé bucco-dentaire où les biosurfactants rhamnolipides ou sophorolipides issus de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia thailandensis* et *Starmerella bombicola* contribueraient à l'hygiène bucco-dentaire par l'élimination des biofilms bactériens ou l'inhibition d'autres cultures bactériennes dans la cavité buccale (Sarubbo et al., 2022).

#### ✓ **Activité antimicrobienne**

Il a été rapporté que les biosurfactants présentent diverses activités antimicrobiennes, incluant des effets antibactériens, antifongiques et antiviraux. Les actinobactéries, un groupe majeur d'eubactéries, ont été largement étudiées pour leur capacité à produire non seulement des antibiotiques, mais aussi d'autres molécules bioactives, parmi lesquelles figurent de nombreux biosurfactants amphipathiques. Ces molécules ont été caractérisées et démontrent un fort potentiel pour des applications variées. Parmi les utilisations potentielles, les biosurfactants produits par les actinobactéries peuvent être employés dans le traitement des infections cutanées et des plaies, grâce à leur capacité à inhiber la croissance de pathogènes résistants. Ils sont également prometteurs comme agents conservateurs dans l'industrie cosmétique et pharmaceutique, où leur faible toxicité et leur activité antimicrobienne permettent de réduire l'usage de composés chimiques (Saimmai et al., 2020).

Bien que les biosurfactants microbiens aient démontré une efficacité contre plusieurs bactéries pathogènes responsables d'infections cutanées, leurs mécanismes d'action précis restent encore partiellement élucidés (Adu et al., 2020).

Il a été suggéré que leurs activités antimicrobiennes (Figure 13) reposent sur plusieurs mécanismes complémentaires, notamment la perturbation des membranes cellulaires par insertion de leur partie hydrophobe, provoquant une perte d'intégrité membranaire et la mort cellulaire. Par ailleurs, les biosurfactants peuvent inhiber la formation des biofilms en réduisant la tension superficielle et en empêchant l'adhésion cellulaire, ce qui diminue la résistance des bactéries aux traitements. D'autres mécanismes incluent la modulation des réponses immunitaires de l'hôte et l'interférence avec la communication bactérienne, perturbant ainsi la régulation de la virulence et du développement des biofilms (Adu et al., 2020).



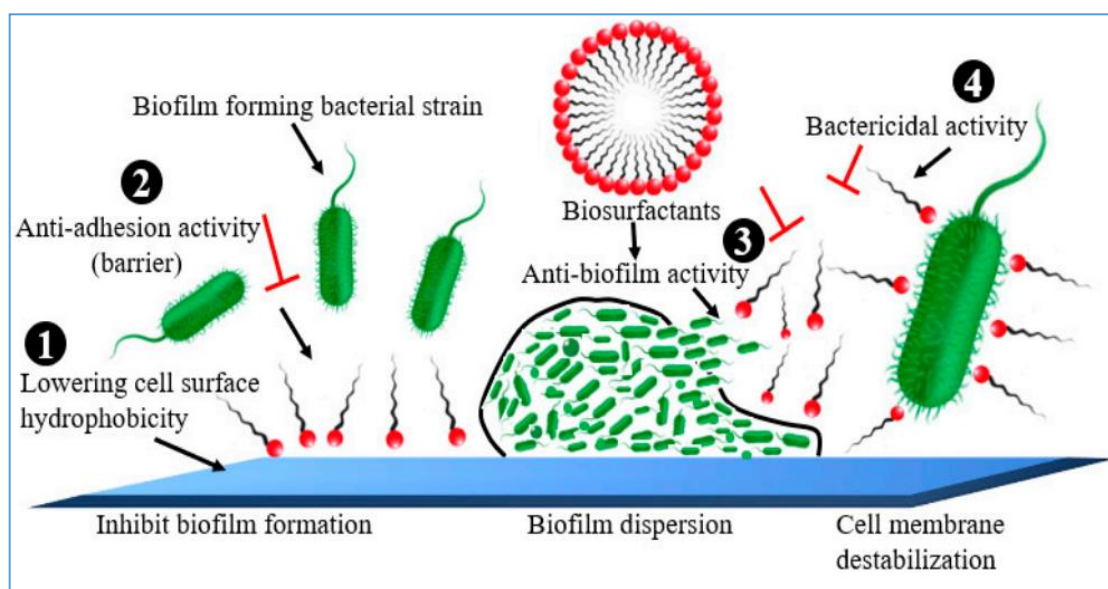
**Figure 13:** Interactions entre les biosurfactants et les cellules bactériennes (Adu et al., 2020).

Mécanismes primaires : perturbation de la membrane cellulaire et des protéines responsables des fonctions essentielles.

#### ✓ Anti- biofilm et antiadhésif

Les propriétés amphipathiques des biosurfactants et leur mouillabilité leur confèrent la capacité d'influencer l'adhésion et la mort des micro-organismes, influençant ainsi directement même les activités de corrosion (sur l'acier inoxydable AISI 30, l'acier au carbone et l'alliage d'aluminium). Les biosurfactants de *Bacillus sp.* (comme la lichenysine produite par *Bacillus licheniformis*) présentent une activité anti-biofilm à la fois dans les traitements pré et post-biofilm (Coronel- León et al., 2016).

Les biosurfactants présentent de fortes caractéristiques antiadhésives ou anti-biofilm et antimicrobiennes, ce qui les rend efficaces contre les souches bactériennes pathogènes et leurs biofilms. Le biosurfactant empêche la formation de biofilms en modifiant l'effet d'adhésion cellulaire en réduisant l'hydrophobicité de la surface cellulaire (Figure 14), en inhibant la chaîne de transport des électrons et en perturbant la membrane, limitant ainsi la demande d'énergie cellulaire (Zeineldin et al., 2023).



**Figure 14:** Mécanismes anti- biofilms des biosurfactants (Zeineldin et al., 2023).

(1) Inhibition de la formation de biofilm en réduisant l'hydrophobicité de la surface cellulaire ou l'activité anti-adhésion ; (2) Inhibition de la formation de biofilm en agissant comme une barrière entre les cellules et la surface de contact – activité anti-adhésion ; (3) Dispersion de biofilm (activité antibiofilm contre le biofilm préformé) ; (4) déstabilisation de la membrane cellulaire (activité bactéricide)

Les biosurfactants sont des agents antiadhésifs qui inhibent l'adhérence des micro-organismes nocifs adsorbés sur une surface solide. Des cathéters urétraux, en vinyle recouverts de surfactant, inhibent les biofilms formés par *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *E. coli* et *Proteus mirabilis*. *Salmonelle sp.* est l'un des principaux groupes de micro-organismes responsables de l'infection des voies urinaires (IVU) chez l'homme (Mireles et al., 2001). Dans plusieurs études, les biosurfactants extraits de *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus fermentum* RC-14 ont été testés pour leur capacité à réduire la colonisation d'*Enterococcus faecalis* ainsi que la formation de biofilms médiés par des levures sur des surfaces de caoutchouc de silicone, matériau couramment utilisé dans les dispositifs médicaux (Heinemann et al., 2000).

### III. Industrie alimentaire

L'application de biosurfactants dans les aliments suscite un vif intérêt ces dernières années en raison de l'intérêt croissant des consommateurs pour les ingrédients issus de la production durable et les produits végétariens et végétaliens. La faible toxicité des tensioactifs microbiens répond aux besoins des consommateurs en aliments plus naturels, contenant moins de composés artificiels et synthétisés chimiquement. Ainsi, les biosurfactants représentent une alternative prometteuse aux additifs alimentaires conventionnels, souvent associés à des effets nocifs sur la santé en cas de consommation excessive (Sarubbo et al., 2022).

Par exemple, les glycolipides biosourcés peuvent être utilisés comme agents émulsifiants naturels dans les produits alimentaires transformés, offrant une meilleure biodégradabilité et une moindre toxicité par rapport aux émulsifiants synthétiques comme les mono- et diglycérides d'acides gras. Ils peuvent être aussi utilisés pour améliorer les formulations en modifiant la viscosité ou la texture, ainsi qu'en inhibant la croissance de certains micro-organismes pathogènes, ce qui améliore la durée de conservation, la qualité et la sécurité sanitaire des aliments (Sarubbo et al., 2022).

La littérature décrit de nombreux biosurfactants présentant une stabilité thermique dans des conditions défavorables (pH et concentration en sel). Des micro-organismes sont récemment identifiés pour la production de biosurfactants tel que : les levures (*Starmerella bombicola*, *Candida sphaerica*, *Candida lipolytica*, *Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Meyerozyma guilliermondii*) qui présentent un potentiel de production de composés dotés d'activités émulsifiantes et tensioactives, ainsi que de propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Les produits de boulangerie (pains, gâteaux, biscuits et muffins) et les vinaigrettes se distinguent parmi les applications étudiées, ainsi que les huiles aromatisantes et les crèmes glacées pour contrôler la solubilisation et la consistance, et intensifier les arômes (Sarubbo et al., 2022).

### IV. Industrie des détergents

Le marché des détergents comprend les produits d'hygiène personnelle, d'entretien ménager et de nettoyage industriel intensif. Les tensioactifs utilisés dans les formulations de cette industrie sont généralement issus de l'industrie pétrochimique. Des biosurfactants produits par des bactéries comme *Bacillus subtilis* et *Ochrobactrum intermedium* ont montré une efficacité supérieure à celle des détergents commerciaux pour éliminer des taches telles que l'huile végétale et le café (Sarubbo et al., 2022).

La surfactine, notamment, présente de nombreux avantages : faible toxicité, absence d'irritation, excellentes propriétés émulsifiantes et mouillantes, bonne stabilité, biodégradabilité et pouvoir moussant élevé. Ces caractéristiques font des biosurfactants une alternative écologique et performante aux tensioactifs chimiques (Sarubbo et al., 2022).

## V. Agriculture

Des bio-tensioactifs sont comme la surfactine produite par *Bacillus subtilis* sont utilisées non seulement pour nettoyer les taches d'huile mais aussi en agriculture comme un agent antifongique. Elle peut inhiber la croissance de champignons pathogènes comme *Fusarium* ou *Botrytis*, responsables de maladies des plantes. Intégrée dans des formulations de pesticides biologiques, la surfactine remplace les tensioactifs chimiques, réduisant ainsi les risques pour l'environnement et la santé humaine (Sarubbo et al., 2022).

Les biosurfactants naturels comme les rhamnolipides et les lipopeptides améliorent la qualité des sols en agissant comme agents de bioremédiation. Ils permettent de décontaminer les sols, les eaux et les déchets pollués par des substances toxiques, telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et certains métaux lourds. Cette propriété est bénéfique pour l'agriculture car elle favorise une meilleure santé des sols et donc une production agricole plus durable (Sarubbo et al., 2022).

Grâce à leur activité antimicrobienne, les biosurfactants des classes lipidiques du mannosylérythritol, des rhamnolipides et des lipopeptides peuvent également être utilisés comme biopesticides pour lutter contre différents ravageurs, agents pathogènes, champignons phytopathogènes et mauvaises herbes (Sarubbo et al., 2022).

Les lipopeptides produits par *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas fluorescens* provoquent respectivement la lyse des zoospores de *Phytophthora capsici*, responsables de la fonte des semis des concombres et inhibent la croissance de phytopathogènes tels que *Pythium ultimum*, *Fusarium oxysporum* et *Phytophthora cryptogea*. D'autres lipopeptides et certains glycolipides ont également montré des résultats prometteurs dans ce domaine concernant l'inhibition de l'action des pucerons, des moustiques et des toxines nocives produites par le champignon *Aspergillus parasiticum* dans les cultures d'arachide, de coton et de maïs, prévenant ainsi les infections microbiennes et les infestations parasitaires (Sarubbo et al., 2022).

Les biosurfactants et les micro-organismes producteurs de biosurfactants peuvent également servir de nutriments aux plantes (source de carbone) et favoriser l'absorption de substances essentielles à leur bon développement grâce à la distribution efficace des métaux et des micronutriments dans le sol et à la production de biofilm sur les racines, tout en protégeant les plantes des substances nocives (Sarubbo et al., 2022).

## VI. Nanotechnologie

Les biosurfactants peuvent être utilisés en nanotechnologie pour synthétiser des nanoparticules de façon écologique. Par exemple, *Bacillus subtilis* produit des nanoparticules d'or et d'argent sans recourir à des procédés chimiques polluants, en agissant comme agent réducteur et stabilisant. Les biosurfactants de *Pseudomonas aeruginosa* et *Brevibacterium casei* stabilisent efficacement les nanoparticules, utiles notamment pour améliorer la récupération du pétrole grâce à leurs propriétés tensioactives et antimicrobiennes, bien que leur usage en bioremédiation reste à développer (Sarubbo et al., 2022).

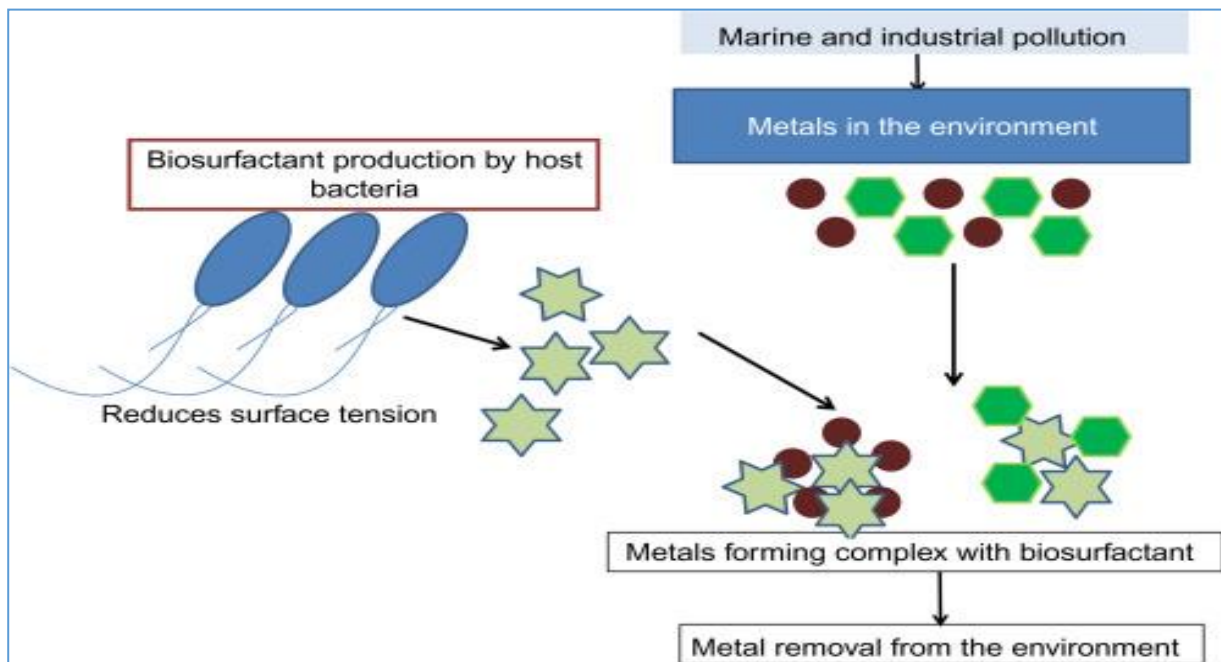
## VII. Cosmétique

L'industrie cosmétique cherche à remplacer les ingrédients synthétiques par des actifs naturels pour limiter les allergies, les irritations et l'impact environnemental des tensioactifs chimiques. Les biosurfactants microbiens, tels que les glycolipides et lipopeptides, possèdent des propriétés antimicrobiennes, hydratantes et peu toxiques, en faisant de bons substituts aux tensioactifs chimiques en cosmétique. Certains biosurfactants offrent des effets spécifiques : hydratation (mannosylérythritol lipide), action antivirale et antibactérienne (tréhalolipides), photoprotection, pouvoir moussant (surfactine) ou réépithélialisation (rhamnolipides) (Sarubbo et al., 2022).

## VIII. Bioremédiation

Les déversements de produits pétroliers contribuent significativement à la contamination des sols et des ressources en eau par des composés toxiques, notamment les composés organiques volatils (COV), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les métaux lourds. Ces polluants représentent une menace majeure pour les écosystèmes aquatiques et la santé humaine. La bioremédiation, en exploitant des micro-organismes producteurs de biosurfactants, constitue une approche efficace et durable pour restaurer ces milieux contaminés (figure 15) (Cameotra et Makkar, 2010).

Les biosurfactants, tels que la surfactine de *Bacillus subtilis*, facilitent la solubilisation et la dégradation des hydrocarbures, tout en formant des complexes avec des ions métalliques toxiques comme le plomb ( $Pb^{2+}$ ) et le cadmium ( $Cd^{2+}$ ), augmentant leur biodisponibilité et permettant leur mobilisation et récupération. Cette méthode permet ainsi une dépollution ciblée, réduisant l'impact environnemental et les risques sanitaires liés à la contamination pétrolière (Chakraborty et Das, 2014).



**Figure 15:** Elimination des métaux toxiques par des biosurfactants (Chakraborty et Das, 2014).

## *Partie expérimentale*

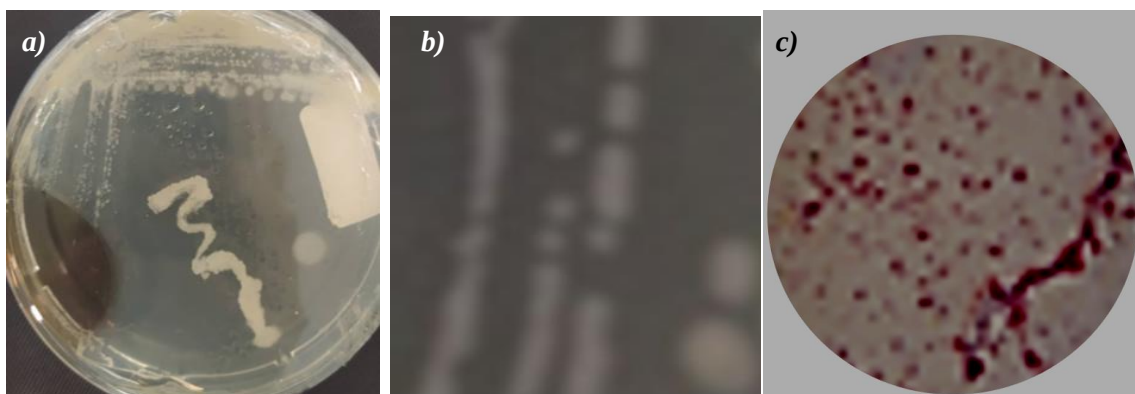
# *Chapitre I :*

## *Matériel et méthodes*

## Chapitre I: Matériel et méthodes

### I. Origine de biosurfactant étudié (BLA 2906)

Le biosurfactant codé BLA 2906 qui fait objet de cette étude est produit par la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD-2906. C'est une bactérie Gram négative isolée par la technique d'enrichissement sur le Milieu Salé Minéral (MSM), à partir des sédiments d'oued Soummam, Bejaia en Algérie. Elle est reconnue pour sa capacité à dégrader le pétrole et à produire un biosurfactant de type lipopeptide BLA 2906. Elle est identifiée par séquençage de l'ARN ribosomique 16S et par caractérisation phénotypique. La séquence est déposée au Genbank sous le numéro d'accension MT103125. La figure 16 montre les aspects de la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD-2906 : macroscopique (gélose nutritive) et microscopique, obtenu après coloration de Gram.



**Figure 16:** Photographies de la souche *Alcaligenes aquatilis*.

- a) et b) : Aspects macroscopiques des colonies de la souche *A. aquatilis* après croissance sur gélose nutritive.  
c) : Aspect microscopique de la souche *A. aquatilis* après coloration de Gram (grossissement 100X).

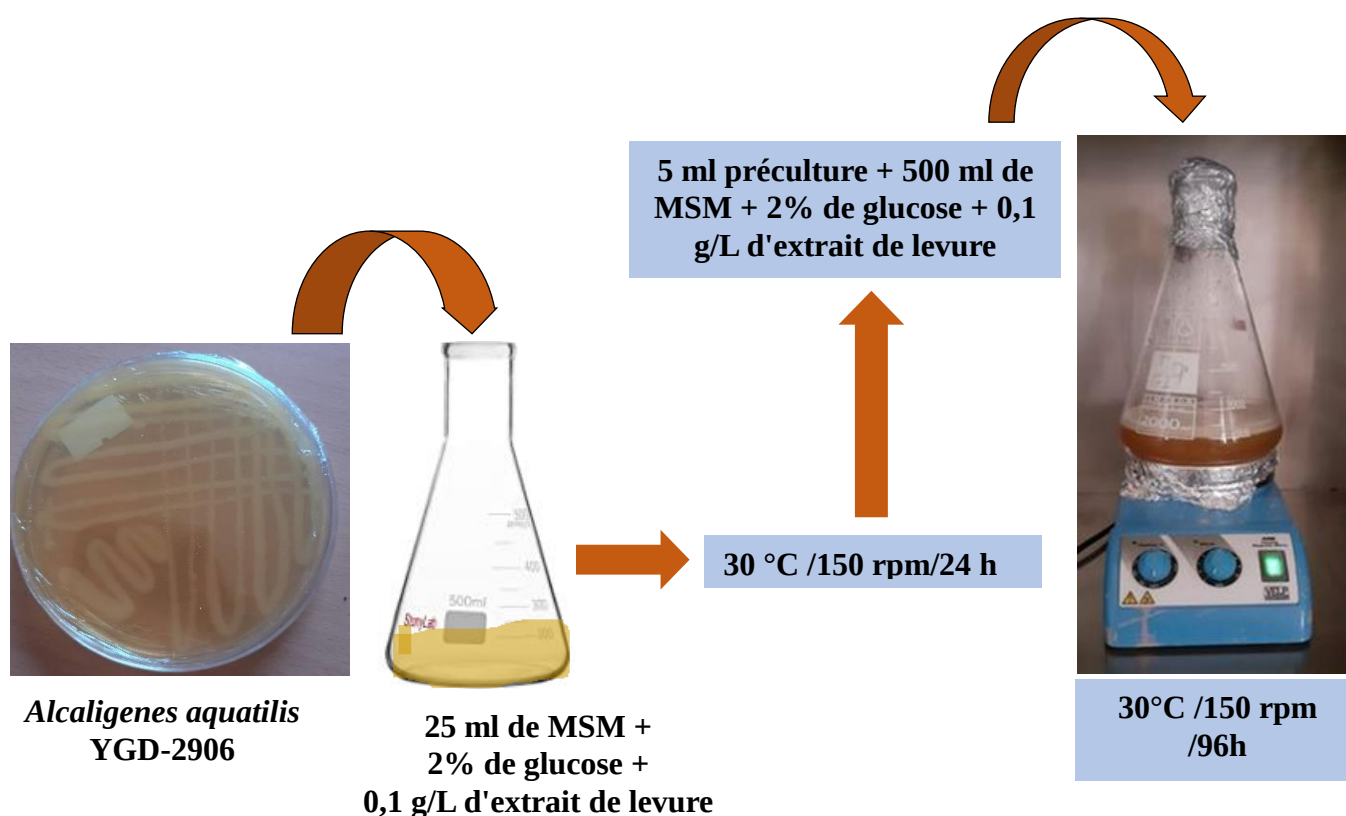
*Alcaligenes aquatilis* est une bactérie à Gram négatif, en forme de bacille, appartenant à la famille des Alcaligenaceae. Elle est aérobic stricte, mobile grâce à des flagelles, et positive aux tests catalase et oxydase. Cette espèce est principalement retrouvée dans des milieux aquatiques naturels ou légèrement pollués, tels que les rivières, les lacs ou certaines eaux usées. Elle joue un rôle écologique important grâce à sa capacité à dégrader divers composés organiques, ce qui lui confère un potentiel intéressant en bioremédiation et dans le traitement des eaux contaminées. Bien que présente dans l'environnement, *Alcaligenes aquatilis* est généralement considérée comme non pathogène pour l'homme. Son métabolisme actif et sa résistance à certains stress environnementaux en font une bactérie d'intérêt pour les applications environnementales et biotechnologiques. La souche étudiée montre des cellules

bactériennes en forme de bâtonnet, mesurant environ 0,7 à 0,9  $\mu\text{m}$  de large et 1,2 à 1,5  $\mu\text{m}$  de long, avec des flagelles péritriches (Yalaoui-Guellal et al., 2021).

## II. Production de biosurfactant BLA 2906

Le processus de la fermentation submergée discontinue (batch) est appliqué pour la production de biosurfactant BLA 2906. Selon le protocole de Kim et al. (2006), une seule colonie de la souche bactérienne *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 est transférée dans un erlenmeyer de 100 mL contenant 25 mL de bouillon MSM (Annexe 1), suivi d'une incubation à 30 °C sous agitation 150 tr /min pendant 24 h (figure 17).

Ensuite, 5 mL de pré-culture est inoculé dans un Erlen de 2L, avec 500 mL de MSM complété par 2 % de glucose et 0,1 g/L d'extrait de levure. Ce milieu est incubé à 30 °C sous agitation rotative de 150 tr/min pendant 96 h. Après cette période d'incubation, le bouillon de culture est centrifugé à une vitesse de 12 000 g à 4 °C/20 min, la partie du surnageant est récupérée, puis analysée.



**Figure 17:** Schéma du procès de production de biosurfactant BLA 2906

### III. Capacité de production

#### III.1. Test hémolytique

Le test hémolytique représente la capacité des colonies bactériennes, lorsqu'elles sont cultivées sur une gélose au sang, à induire une hémolyse en synthétisant une substance appelée hémolysine. Cette substance est considérée comme un facteur de virulence important et elle est produite par diverses espèces bactériennes. Elle est responsable de la lyse cellulaire et de la destruction des cellules et tissus voisins afin de fournir des nutriments, principalement du fer, aux bactéries productrices des toxines (Bullen et al., 2005).

La souche est ensemencée sur des boîtes de gélose au sang (5 %, v/v) et incubée à 30 °C pendant 24 à 48 h. L'activité hémolytique est détectée par la présence d'une zone claire autour d'une colonie (Hassanshahian, 2014).

La quantité d'activité hémolytique est déterminée par mesure du diamètre du halo autour des colonies cultivées sur gélose au sang à l'aide d'une règle (Jain et al., 1991 ; Youssef et al., 2004) :

- (-) croissance sans formation de halo,
- (+) hémolyse complète avec un diamètre de lyse inférieur à 1 cm,
- (++) hémolyse complète avec un diamètre de lyse entre 1 et 2 cm,
- (+++ ) hémolyse complète avec un diamètre de lyse entre 2 et 3 cm,
- (++++ ) hémolyse complète avec un diamètre de lyse supérieur à 3 cm.

#### III.2. Mesure de l'indice d'émulsion ( $E_{24}$ )

L'indice d'émulsion permet de vérifier la capacité de production de biosurfactant par la souche étudiée à émulsionner une phase hydrophobe (pétrole brut) dans une phase hydrophile (milieu de culture). Ce test consiste à étudier la capacité de la souche bactérienne *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 de produire des biosurfactants.

L'activité d'émulsification ( $E_{24}$ ) est déterminée par addition d'un volume de pétrole au même volume de bouillon de culture sans cellules (sans bactéries). La mixture est agitée rigoureusement pour 2 min en utilisant un vortex suivi d'un repos de 24 h. Le résultat est exprimé à l'aide de la formule suivante (Emtiazi et al., 2009) :

$$E_{24} (\%) = (He \text{ (mm)} / Ht \text{ (mm)}) * 100$$

$E_{24}$  : Indice d'émulsion après 24 h.

$He$  : Hauteur de la couche d'émulsion.

$Ht$  : Hauteur totale du liquide.

Les émulsions formées sont comparées à celles formées par une solution aqueuse à 0,35 % (p/v) de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) qui est utilisé comme contrôle positif (Yalaoui-Guellal et al., 2018).

### **III.3. Test de déplacement de l'huile**

Pour évaluer la capacité de déplacement d'huile, 50 mL d'eau distillée sont versés dans une grande boîte de Pétri de 15 cm de diamètre. Ensuite, 20 µL de pétrole brut sont déposés délicatement à la surface de l'eau, formant une fine couche. Dix microlitres de la culture bactérienne sont ensuite ajoutés à la surface de cette couche d'huile, conformément à la méthode décrite par Morikawa et al. (2000). Le déplacement de l'huile est évalué en mesurant le diamètre de la zone claire formée à la surface, en millimètres (mm). Pour chaque culture de la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906, les mesures sont effectuées en triple afin d'assurer la fiabilité des résultats.

### **III.4. Test d'effondrement de la goutte**

Dans la méthode d'effondrement de la goutte, le surnageant d'isolat bactérien est placé sur une lame de verre. Ensuite, du pétrole est ajouté à la surface du surnageant. Si la goutte de pétrole sur le surnageant devient plate en 1 min après l'ajout, le résultat est considéré comme positif. Si la goutte reste perlée, le résultat est noté négatif indiquant le manque de production de biosurfactant. Le SDS est choisi comme témoin positif (Płaza et al., 2006).

## **IV. Extraction et récupération de biosurfactant BLA 2906**

L'extraction de biosurfactant BLA 2906 produit par la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 est réalisée après 96 h d'incubation. Après la centrifugation, le surnageant obtenu est soumis à une précipitation acide à pH 2,0 – 3,0 en utilisant une solution de HCl 6N puis il est laissé à 4 °C pendant une nuit (Peypoux et al., 1999 ; Chandran et Das, 2010).

Par la suite, le culot est collecté après centrifugation à 20 000g / 20 min / 4°C, puis lyophilisée (Yalaoui-Guellal et al., 2018).

## **V. Mesure du poids sec**

Le poids du biosurfactant est déterminé en utilisant la méthode de Chandran et Das (2010). Le bouillon de culture est centrifugé à 12 000 g pendant 20 min et il est extrait avec le mélange chloroforme/méthanol (2 :1, v/v). Les solvants sont ensuite éliminés par évaporation

rotative. Le résidu est placé dans la boîte de Pétri stérile. Ensuite, il est pesé et placé dans le four à air chaud pour être séché à 100 °C pendant 30 min. Le poids de bio-tensioactif est calculé en utilisant la formule ci-dessous et il est exprimé en grammes par litres (poids sec) :

$$Wb = Wpb - Wp$$

**Wb** : Poids sec de biosurfactant.

**Wpb**: Poids de la boîte de Pétri et résidu de biosurfactant après séchage.

**Wp**: Poids de la boîte à Pétri vide.

## **VI. Détermination du profil biochimiques**

Le biosurfactant (BLA 2906) brut lyophilisé est utilisé pour la détermination de son profil biochimique.

### **VI.1. Détermination des protéines**

La teneur totale en protéines des biosurfactants est déterminée selon la méthode décrite par [Bradford \(1976\)](#) en utilisant de l'albumine de sérum bovin (BSA) comme standard. Un volume de 1 mL de réactif de Bradford (Annexe 1) est mélangé avec 20 µL de l'échantillon ou de standard et le mélange est bien agité. Une lecture de l'absorbance est effectuée à 595 nm. Le résultat est exprimé en mg E de BSA par 100 g de poids sec à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

### **VI.2. Détermination des glucides**

Le test à l'anthrone est effectué pour déterminer la présence d'une fraction glucidique dans l'échantillon de biosurfactant. Dans ce test, un volume de 5 mL de la solution de biosurfactant (10 mg/ mL) et 5 mL du réactif d'anthrone (Annexe 1) sont mélangés. S'il y a un changement de couleur, le test est positif. Donc, il y a présence d'un fragment glucidique ([Patowary et al., 2015](#)).

### **VI.3. Détermination des lipides**

L'estimation de la teneur en lipides est effectuée par la technique de [Bligh et Dyer \(1959\)](#). Une quantité de 10 mg de biosurfactant lyophilisé est mélangée avec 2 mL d'eau distillée pour réhydrater la prise d'essai.

L'extraction est effectuée à l'aide d'un mélange de chloroforme, méthanol et eau dans un rapport volumique de 2:2:0,8 (v/v/v). Le mélange est vigoureusement agité pendant 2

minutes, puis 2,5 mL de chloroforme et 2,5 mL d'eau sont ajoutés. Cette opération conduit à la formation d'un système diphasique :

- La phase inférieure, riche en chloroforme, contient les lipides extraits,
- Tandis que la phase supérieure, composée d'eau et de méthanol, renferme les matières organiques co-extraites.

Le chloroforme est récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur. La phase eau-méthanol est rincée deux fois par 5 mL de chloroforme. Le solvant d'extraction est évaporé (40-60 °C ; 20 min). L'extrait obtenu est mis au dessiccateur (20 min) pour refroidissement puis il est pesé pour la détermination des lipides totaux. Les lipides exemptés de solvant sont pesés et le rendement de l'extraction est déterminé par la formule suivante :

$$\text{Lipides (\%)} = (m / M) * 100$$

**m** : Masse des lipides extraits

**M** : Masse de l'échantillon.

#### **VI.4. Analyse spectrale UV**

La spectroscopie UV-Visible permet d'accéder qualitativement à des renseignements quant à la nature des liaisons présentes au sein de l'échantillon mais également de déterminer quantitativement la concentration d'espèces absorbant dans ce domaine spectral (Bernard et al., 2023). Une solution de biosurfactant (2 mg/mL) dissoute dans du méthanol est soumise à un balayage spectrophotométrique dans la gamme UV (ultraviolet), avec des longueurs d'onde allant de 190 à 400 nm. Le solvant d'extraction, à savoir le méthanol, a servi de blanc pour cette analyse (Wang et al., 2007).

#### **VI.5. Analyse par CCM**

La CCM est une technique de séparation des constituants d'un mélange, basée sur leurs affinités respectives pour les phases stationnaire et mobile. Cette technique est utilisée dans un but analytique qualitatif (Munier, 1968).

La CCM est régulièrement utilisée pour la détection de biosurfactant dans des extraits de bouillon de culture (Janek et al., 2013 ; Laabei et al., 2014).

Une petite quantité de l'extrait brut lyophilisé est dissoute dans du chloroforme et des spots sont déposés au point d'origine à proximité du fond de la plaque de gel de silice 60. Les plaques sont développées dans un système de solvants : chloroforme-méthanol-acide acétique

(6,5/1,5/0,2 ; v/v/v), pour la mise en évidence des glycolipides, et chloroforme-méthanol-eau (65/15/4 ; v/v/v, pour révéler les lipopeptides (Smyth et al., 2014 ; Noparat et al., 2014).

Lorsque le développement est achevé (front de solvant est d'environ 1 cm de haut de la plaque), les plaques sont retirées et laissées pour séchage à l'air sous la hotte. Les points sont révélés par pulvérisation avec : (a) le réactif à l'antrone (Annexe 1) pour la détection des fractions des glucides ; (b) la solution de ninhydrine (Annexe 1) pour la détection de composés avec des groupes amino libres. Les plaques sont chauffées à 110 ° C pendant 5 à 20 min (Smyth et al., 2014 ; Noparat et al., 2014).

#### **VI.6. Analyse par FTIR**

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est l'un des outils spectroscopiques les plus utilisés pour la caractérisation des molécules. Cette technique est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet, via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes (Obinaju et Martin, 2016 ; Das et al., 2008a).

La spectroscopie FTIR par la méthode de KBr (bromure de potassium) pellet est réalisée dans cette étude pour déterminer la nature chimique et les groupes fonctionnels de l'extrait brut de biosurfactant étudié. Une quantité de 0,02 g de biosurfactant BLA2906 est broyée avec 0,08 g de KBr dans un mortier pendant 30 secondes pour obtenir des pastilles translucides. Les spectres FTIR sont obtenus à une fréquence comprise entre 4000–500 cm<sup>-1</sup> (Das et al., 2008b).

#### **VI.7. Analyse par MALDI-TOF-MS**

La spectrométrie MALDI-TOF est une technique analytique puissante utilisée pour identifier des biomolécules (protéines, peptides, lipides, etc.) en les ionisant en douceur pour les analyser par la spectrométrie de masse. L'instrument est étalonné à l'aide d'un mélange de 4 peptides. Une concentration de 1 mg/mL est obtenue après reconstitution et dilution de l'échantillon de biosurfactants dans du méthanol (Tearu et al., 2014).

L'acide dihydroxybenzoïque est utilisé comme solution matricielle (Tearu et al., 2014) et une plage de masses de 400 à 2000 Da est sélectionnée car les lipopeptides les plus connus se situent dans cette plage (Smyth et al., 2010 ; Meena et al., 2017).

**VI.8. Analyse de biosurfactant BLA 2906 par HPLC-MS/MS**

La technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS) est une méthode analytique puissante permettant la séparation, l'identification et la quantification précise de composés présents dans des mélanges complexes, comme les biosurfactants. Les composés sont d'abord séparés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en fonction de leurs interactions différentielles avec :

- Une phase stationnaire (colonne chromatographique), et
- Une phase mobile (solvants en gradient ou isocratique).

Dans cette analyse, une colonne Agilent Poroshell 120 EC-C18 (dimensions :  $2,1 \times 100$  mm, granulométrie :  $2,7 \mu\text{m}$ ) est utilisée comme phase stationnaire. Cette colonne à base de silice modifiée (C18) est bien adaptée à la séparation des composés semi-polaires à apolaires, tels que les lipides ou les lipopeptides présents dans les biosurfactants.

La phase mobile se compose de :

- Solvant A : eau contenant 1 % d'acide formique, et
- Solvant B : acétonitrile, un solvant organique polaire.

Ce système de solvants permet une bonne élution des composés polaires et apolaires tout en facilitant leur ionisation en phase MS. L'analyse est effectuée à l'aide d'un système LC P400 (ThermoFinnigan) couplé en ligne à un spectromètre de masse LCQ Deca XP Plus à piège à ions quadripolaire, également de ThermoFinnigan. L'appareil est équipé d'une source d'ionisation par électrospray (ESI), utilisée ici en mode d'ionisation positive.

L'ionisation électrospray (ESI) permet de transférer les analytes en phase liquide vers la phase gazeuse sous forme d'ions chargés positivement, sans fragmentation importante, ce qui est idéal pour des composés sensibles comme les biosurfactants. Une fois ionisés, les composés sont détectés et analysés en spectrométrie de masse tandem (MS/MS), où ils subissent des étapes successives de fragmentation, permettant d'obtenir des spectres caractéristiques pour l'identification structurale précise des molécules (Pecci et al., 2010).

**VII. Etude de la stabilité**

Les études de la stabilité de biosurfactant BLA 2906 sont réalisées pour l'effet de la température, du pH et de la salinité sur la capacité d'émulsification du biosurfactant. L'analyse est effectuée en utilisant l'extrait brut de biosurfactant BLA 2906 (0,5 %, p / v) dans un tampon phosphate de potassium (50 mM, pH 7,0). L'extrait est ajusté avec HCl ou NaOH

(1N) pour obtenir des pH de 2 à 12. La solution de NaCl est ajoutée à l'échantillon pour obtenir les concentrations finales de 0 à 21 % (p / v). Pour l'étude thermique de la stabilité, l'extrait brut est incubé pendant 1 h à différentes températures (30 à 121 °C) et refroidi à 30 °C. L'activité émulsifiante est ensuite déterminée. Le SDS est utilisé pour comparer l'activité avec l'extrait brut de biosurfactant de la souche étudiée (Maneerat et Phetrong, 2007).

## VIII. Propriétés biologiques

### VIII.1. Détermination des activités antimicrobiennes

L'évaluation des activités antibactérienne et antifongique de biosurfactant BLA 2906 est réalisée par la technique de spot (Rahal, 2006).

La méthode se repose sur une diffusion du composé antimicrobien en milieu solide dans une boîte de Pétri, en créant un gradient de concentration pendant un temps de contact entre le microorganisme et le produit testé. Le diamètre d'inhibition quantifié l'effet du produit antimicrobien sur la cible, et la souche est qualifiée de sensible, très sensible, extrêmement sensible ou résistante (Adjali et Ziouche, 2016). L'activité antimicrobienne de biosurfactant est évaluée en utilisant des souches de référence (bactéries, champignons et levures) qui sont représentées dans le tableau III.

**Tableau III:** Différents microorganismes testés avec le biosurfactant étudié (BLA 2906).

| Type de microorganismes | Microorganismes testés | Références                                  |
|-------------------------|------------------------|---------------------------------------------|
| Bactéries à             | Gram+                  | <i>SARM</i><br>ATCC 43300                   |
|                         |                        | <i>Staphylococcus aureus</i><br>NCCB 9163   |
|                         | Gram-                  | <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922       |
|                         |                        | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 |
| Champignons filamenteux |                        | <i>Aspergillus niger</i><br>NRRL 939        |
|                         |                        | <i>Aspergillus flavus</i><br>NRRL 3251      |
|                         |                        | <i>Aspergillus parasiticus</i><br>CBS 5     |
|                         |                        | <i>Aspergillus ochraceus</i><br>NRRL 3174   |
| Levure                  |                        | <i>Candida albicans</i><br>ATCC 1024        |

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

**ATCC**: American Type Culture Collection

**NCCB**: National Collection of Cultures of Microorganisms

**NRRL**: National Center for Agricultural Utilization Research

**CBS** : Central Bureau for Fungal Cultures

**VIII.1.1. Préparation des dilutions de biosurfactants**

Un extrait brut de biosurfactant est préparé dans le méthanol à 1% (v/v) et il est passé à travers un filtre à membrane de 0,22 µm. Le filtrat est conservé dans un flacon de verre stérile jusqu'au moment d'analyse.

**VIII.1.2. Détermination de l'activité antibactérienne**

L'inoculum bactérien est préparé à partir d'une culture pure et jeune (âgée de 18 heures). Un inoculum de chaque souche-test est préparé avec de l'eau physiologique stérile (0,9 % de NaCl). Après homogénéisation, la suspension est ajustée avec une solution physiologique stérile pour atteindre une turbidité de 0,5 Mc Farland pour une concentration finale de  $10^8$  UFC/ML ([Brahmi et al., 2016](#)).

Ensuite, un ensemencement par écouvillonnage est effectué sur la gélose Muller Hinton (Annexe 1) coulée dans des boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm, préalablement séchée à l'étuve à 37 °C. L'activité antibactérienne est mise en évidence par un test d'antagonisme direct qui est le test des spots. Après avoir rempli les boîtes de Pétri avec la gélose MH et ensemencée par écouvillonnage par l'inoculum standardisé de chaque bactérie-test, 5 µL de biosurfactant et de ses dilutions sont déposées en spots (le méthanol est utilisé comme témoin négatif) ([Brahmi et al., 2016](#)).

Les boîtes sont mises à 4 °C pendant 2 h puis retournées et incubées à 37 °C durant 18 à 24 h. Au terme de la période d'incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en mm avec une règle ([Brahmi et al., 2016](#)).

**VIII.1.3. Détermination de l'activité antifongique**

Pour la préparation de l'inoculum fongique, une charge de  $10^7$  spores/mL pour chaque souche fongique est déterminée à l'aide d'une cellule de Malassez. L'activité est testée sur milieu Potato Dextrose d'Agar (PDA) (Annexe 1) selon la technique des spots citée ci-dessus. Les boîtes sont incubées à 4 °C pendant 2 h puis à 30 °C pendant 48 h. Au terme de la période d'incubation, le diamètre des zones d'inhibition est mesuré en mm.

**IX. Activité anti-inflammatoire**

L'inhibition de la dénaturation de la BSA est utilisée dans les études d'activités anti-inflammatoires. Elles sont basées sur l'idée que certains composés peuvent inhiber la

dégradation de cette protéine, processus souvent associé à des mécanismes inflammatoires (Chandra et al., 2012).

L'activité anti-inflammatoire du biosurfactant BLA 2906 est déterminée en mélangeant 1 ml de ce dernier (1 et 2 mg/ mL) et 1 mL de solution aqueuse (0,2 %) de BSA préparée dans du Tris-HCL (0,05 M, pH 6,8). L'ibuprofène (2 mg/ mL) est utilisé comme contrôle positif et l'eau distillée comme contrôle négatif. Tous les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 15 min, puis chauffés à 72 °C au bain-marie pendant 10 min pour induire sa dénaturation. Après refroidissement pendant 10 min, l'absorbance est mesurée à 660 nm. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines est calculé à l'aide de la formule suivante (Kandikattu et al., 2013 ; Rani et al., 2014) :

$$(\%) \text{ d'inhibition de la dénaturation des protéines} = [(Abs_c - Abs_s) / Abs_c] * 100$$

**Abs<sub>c</sub>** : Absorbance du contrôle.

**Abs<sub>s</sub>** : Absorbance de l'échantillon.

## X. Détermination de l'activité antioxydante

Il existe plusieurs méthodes chimiques pour l'estimation de l'activité antioxydante (antioxydants exogènes). Les quatre méthodes réalisées dans cette étude sont : le pouvoir réducteur, le test au phosphomolybdate et les activités antiradicalaires contre le DPPH et l'ABTS.

### X.1. Pouvoir réducteur

Le test du pouvoir réducteur est basé sur la réaction de réduction du Fe<sup>3+</sup> présent dans le complexe ferricyanure de potassium en Fe<sup>2+</sup>. La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune, du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>), en couleur verte du fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) (Yildirim et al., 2001).

0,5mL de la solution de biosurfactant est mélangé avec 0,5mL du tampon de phosphate à 0,2M (pH=6,6) et 0,5mL de ferricyanure de potassium K<sub>3</sub>Fe (CN) à 1%. Le mélange est incubé à 50°C pendant 20min. Après incubation, 0,5mL de l'acide trichloroacétique (TCA) à 10% sont ajoutés au mélange. Un volume de 1mL est prélevé du mélange, auquel 1mL d'eau distillée et 200µL de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) à 0,1% sont additionnés. Après 10min, les absorbances sont lues à 700nm (Debbabi et al., 2016). La

capacité antioxydante est exprimée par une courbe d'étalonnage en mg équivalent Trolox (Annexe 2) par gramme de matière sèche (mgET/gMS).

### **X.2. Test au phosphomolybdate**

Le test au phosphomolybdate est basé sur la réduction du Mo(VI) en Mo(V) en présence d'antioxydants, entraînant la formation d'un complexe phosphate/Mo (V) stable, de couleur verte, avec une absorbance maximale à 695 nm (Sahreen et al., 2010).

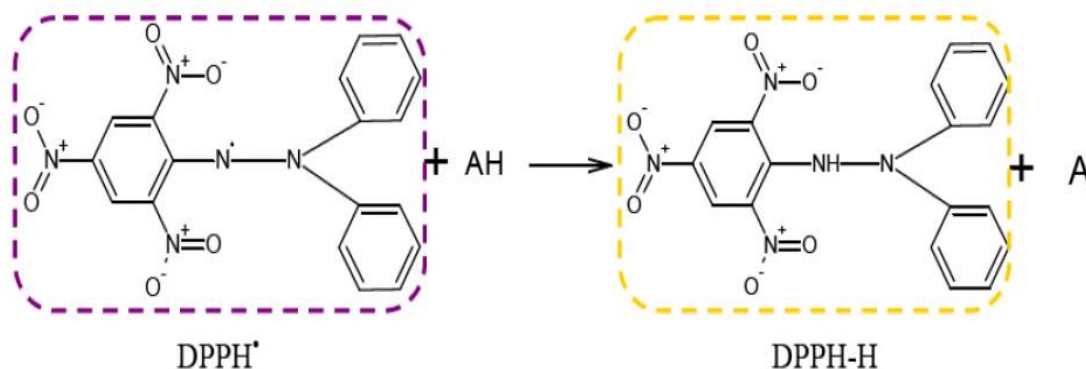
Un volume de 2 mL du réactif de Molybdate, préparé à partir de molybdate d'ammonium à 4 mM, du phosphate de sodium à 28 mM et de l'acide sulfurique à 0,6 mM, est additionné à 200 µL de biosurfactant à différentes concentrations (1000-5000 µg/mL). Après agitation, les tubes sont incubés à 90 °C pendant 90 min. Après refroidissement, la lecture des absorbances est faite à 695 nm (Brahmi et al., 2012).

Les résultats sont exprimés en IC<sub>50</sub> (µg/mL), la concentration de biosurfactant requise pour provoquer une réduction de 50 %. La capacité des biosurfactants étudiés à réduire le molybdate est comparée avec le standard BHA (hydroxyanisole butylé) (Brahmi et al., 2012).

Ces IC<sub>50</sub> sont déterminées graphiquement par la droite de régression dont l'abscisse représente la concentration des échantillons et l'ordonnée l'activité antioxydante en pourcentage (Molyneux, 2004 ; Huang et al., 2005).

### **X.3. Activité scavenger au radical DPPH<sup>•</sup>**

Le DPPH<sup>•</sup> est un radical libre initialement, il est violet et lorsqu'il est réduit par un antioxydant en DPPH-H (diphényle picryl-hydrazine), il devient jaune (Figure 18). L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons. Le changement de couleur peut être suivi par spectrophotométrie à 517 nm (Brand-Williams et al., 1995).



**Figure 18 :** Réduction d'un radical DPPH<sup>•</sup> par un antioxydant (Sanchez-Moreno, 2002).

L'effet scavenger du DPPH<sup>•</sup> est réalisé par la technique de Blois (1958). Un volume de 0,5 mL de la solution de DPPH (0,1 mM) est mélangé avec 1,5 mL de chaque biosurfactant à différentes concentrations (1000-5000 µg/mL). Les mélanges sont laissés à la température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min.

L'absorbance des solutions est ensuite estimée à 517 nm et le pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup> est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$\text{Effet scavenger du DPPH}^\bullet (\%) = [(A_c - A_e) / A_c] * 100$$

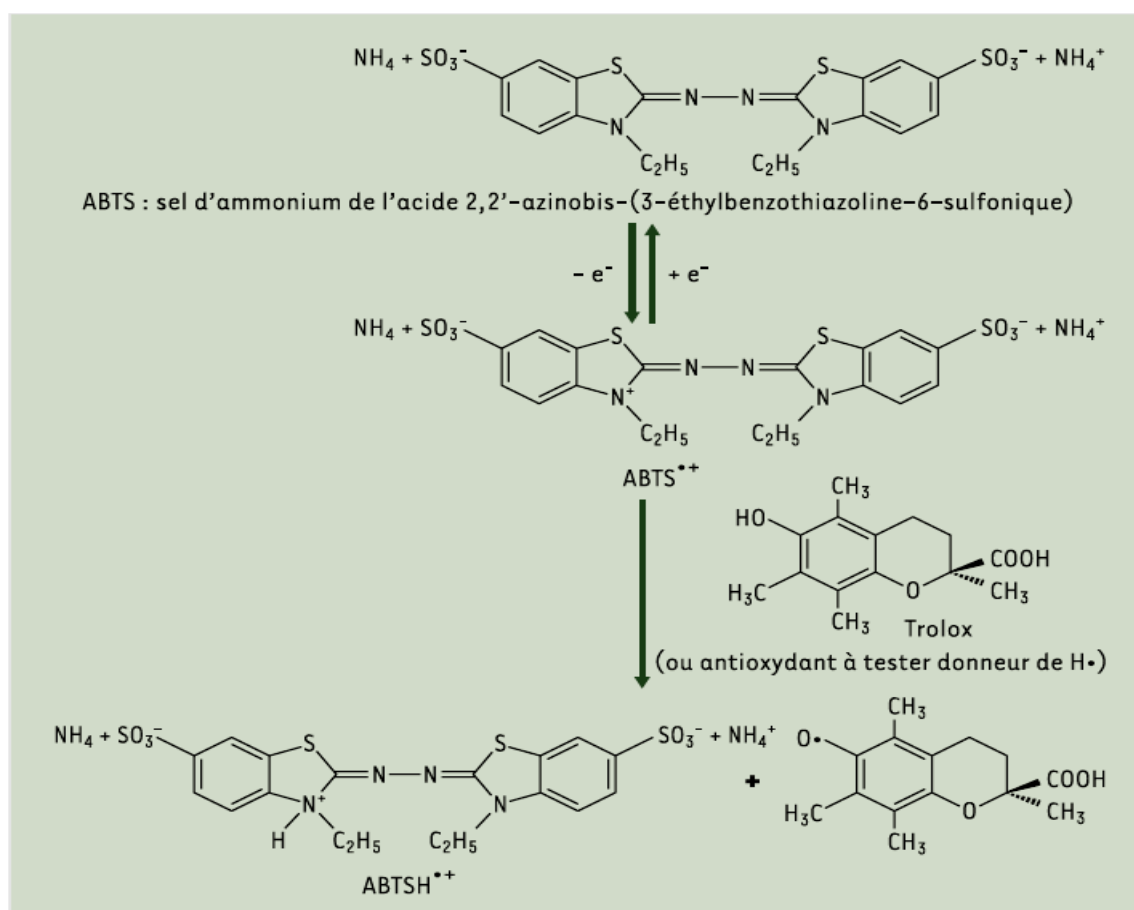
**A<sub>c</sub>** : Absorbance du contrôle.

**A<sub>e</sub>** : Absorbance de l'échantillon.

L'activité antiradicalaire est exprimée en IC<sub>50</sub> (µg/mL). Le pourcentage d'inhibition permet de calculer le paramètre IC<sub>50</sub> qui est défini comme étant la concentration efficace de l'extrait nécessaire pour réduire de 50 % la concentration de DPPH initiale. Le BHA est utilisé comme standard (Molyneux, 2004 ; Huang et al., 2005).

#### X.4. Activité scavenger au radical ABTS<sup>•</sup>

La solution aqueuse de l'ABTS est préparée avec le persulfate de potassium pour générer le radical ABTS<sup>•+</sup> qui est stable et il est de couleur bleu-verte (Figure 19).



**Figure 19 :** Formation et piégeage du radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  par un antioxydant donneur de  $\text{H}^\bullet$  (Marc et al., 2004).

Le radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (absorbant à 734 nm) est formé par arrachement d'un électron  $e^-$  à un atome d'azote de l'ABTS. En présence de Trolox (ou d'antioxydant donneur de  $\text{H}^\bullet$ ), l'atome d'azote concerné piège un  $\text{H}^\bullet$ , conduisant à l' $\text{ABTS}^+$ , ce qui entraîne la décoloration de la solution

Lorsque l'antioxydant est ajouté, la diminution de l'intensité de cette couleur traduit son interaction avec un électron ou un hydrogène provenant de l'échantillon antioxydant (Marc et al., 2004).

Une solution aqueuse contenant 7 mM d' $\text{ABTS}^{\bullet+}$  et 2,45 mM de persulfate de potassium est préparée dans une fiole de 25 mL. Cette solution est incubée à l'obscurité pendant 16 h. Cette solution est diluée avec de l'éthanol pour avoir une solution d'absorbance finale de  $0,70 \pm 0,10$  à 734 nm. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  d'extrait est additionné à un volume de 1000  $\mu\text{L}$  de la solution éthanolique d'ABTS. Après 2,5 min d'incubation, les absorbances sont lues à 734 nm (De Marco et al., 2007). Le pourcentage d'inhibition du radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  est déterminé selon la formule suivante :

$$\% d'inhibition de l'ABTS = [(Ac - Ae) / Ac] * 100$$

**Ac** : Absorbance du contrôle (100 µl éthanol + 1000 µl solution ABTS)

**Ae** : Absorbance de l'échantillon.

## XI. Activité de biosorption des métaux lourds

La méthode utilisée pour évaluer la capacité de biosorption des métaux lourds (Cu, Fe, Pb, Cd et Zn) par le biosurfactant brut est celle décrite par [Shuhong et al. \(2014\)](#).

Pour cela, des solutions métalliques à une concentration de 100 ppm ont été préparées en dissolvant une quantité précise de nitrates de cuivre, de fer, de plomb, de cadmium et de zinc dans de l'eau distillée. Un volume de 10 mL de chaque solution métallique est ajouté à 40 mL de solution de biosurfactant brut BLA 2906, de manière à obtenir une concentration finale de 1 % (p/v) en biosurfactant. Un témoin est préparé pour chaque métal, sans ajout de biosurfactant, afin de servir de contrôle. Le pH de chaque mélange est ajusté à 7 à l'aide de HCl ou de solution NaOH à 0,1 mol/L. Ensuite les mélanges sont incubés à température ambiante, sous agitation constante à 200 tr/min, pendant une durée de 3 heures.

À la fin de l'incubation, les échantillons sont centrifugés à 10 000 tr/min, puis filtrés à travers une membrane d'acétate de cellulose de 0,45 µm. La concentration résiduelle des ions métalliques ( $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ ) présents dans le surnageant est déterminée par spectroscopie d'absorption atomique (SAA). La capacité de biosorption à l'équilibre, notée  $Q_e$  (mg/g), est ensuite calculée à l'aide de l'équation suivante :

$$Q_e = (V (C_i - C_e)) / W$$

**C<sub>i</sub>** : Concentration initiale (contrôle) des différents métaux dans les solutions (mg/L).

**C<sub>e</sub>** : Concentration finale (échantillon) des différents métaux dans les solutions (mg/L).

**V** : Volume des échantillons (L).

**W** : Masse de biosurfactant (g).

## XII. Optimisation de la production de biosurfactant BLA 2906

L'optimisation de la production de biosurfactant BLA 2906 par la bactérie *Alcaligenes aequalis* YGD 2906 par l'utilisation d'une conception expérimentale en deux phases. La première phase consiste à la sélection des constituants importants du milieu qui ont considérablement influencé la production de biosurfactant BLA2906 en appliquant un plan factoriel fractionnaire (Plackett-Burman). Dans la deuxième étape, les niveaux des variables,

qui ont des influences significatives sur le processus de production, sont optimisés davantage à l'aide de la conception de la méthodologie de surface de réponse (RSM).

### **XII.1. Conception de Plackett-Burman**

Le plan de Plackett-Burman est une méthode de criblage statistique utilisée en planification expérimentale pour identifier rapidement les facteurs les plus influents parmi un grand nombre de variables. Il s'agit d'un plan factoriel fractionnaire à deux niveaux, dans lequel chaque facteur est étudié à deux niveaux codés : haut (+1) et bas (-1). Par convention, un niveau moyen (0) peut également être introduit à titre informatif ou dans des expériences complémentaires, bien qu'il ne fasse pas partie du plan de base.

L'avantage majeur de cette méthode est qu'elle permet d'étudier ( $n - 1$ ) variables indépendantes en seulement  $n$  expériences, ce qui en fait un outil très efficace et économique pour le criblage initial, surtout lorsque le nombre de variables est élevé. Le plan est particulièrement utile pour déterminer rapidement quelles variables ont un effet significatif sur la réponse mesurée, sans étudier en profondeur les interactions entre elles.

Dans le cadre de cette étude, plusieurs variables susceptibles d'influencer la production du biosurfactant par *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 ont été sélectionnées. Chacune d'entre elles a été testée à différents niveaux (haut, moyen ou bas), comme indiqué dans le tableau IV, afin de déterminer leur impact potentiel sur la réponse expérimentale. Les résultats de ce plan permettront de sélectionner les facteurs les plus pertinents pour des études plus approfondies, comme le plan d'optimisation de surface.

**Tableau IV:** Niveaux de variables affectant la production de BLA 2906.

| Variables                               | Symboles | Niveaux |       |     |
|-----------------------------------------|----------|---------|-------|-----|
|                                         |          | -1      | 0     | 1   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (g/L)   | A        | 2       | 4     | 6   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)   | B        | 1       | 2     | 3   |
| NaCl (g/L)                              | C        | 2       | 3     | 4   |
| NaNO <sub>3</sub> (g/L)                 | D        | 1       | 2     | 3   |
| CaCl <sub>2</sub> (g/L)                 | E        | 0,05    | 0,125 | 0,2 |
| MgSO <sub>4</sub> (g/L)                 | F        | 0,5     | 1     | 1,5 |
| FeSO <sub>4</sub> (g/L)                 | G        | 0,01    | 0,055 | 0,1 |
| Glucose (g/L)                           | H        | 10      | 15    | 20  |
| Déchets d'huile (g/L)(huile de friture) | I        | 10      | 15    | 20  |
| Extrait de levure (g/L)                 | J        | 0,5     | 1     | 1,5 |
| pH                                      | K        | 6       | 7     | 8   |
| Température d'incubation (°C)           | L        | 30      | 33    | 36  |
| Temps d'incubation (jours)              | M        | 3       | 5     | 7   |
| Agitation (rpm)                         | N        | 100     | 150   | 200 |

Quatre répétitions du point central sont effectuées pour chaque plan au niveau intermédiaire de chaque variable afin d'estimer l'erreur expérimentale, en tenant compte de l'importance relative des divers facteurs de fermentation impliqués dans la production du biosurfactant BLA 2906. Un plan de vingt et un tests différents est réalisé et les configurations sont présentées dans le tableau V.

**Tableau V:** Matrice de conception de Plackett-Burman.

| Ordre<br>d'exécution | Valeurs expérimentales |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|----------------------|------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                      | A                      | B  | C  | D  | E  | F  | G  | H  | I  | J  | K  | L  | M  | N  |
| 1                    | 1                      | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  |
| 2                    | -1                     | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 |
| 3                    | -1                     | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 |
| 4                    | 1                      | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  |
| 5                    | 1                      | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 |
| 6                    | -1                     | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  |
| 7                    | -1                     | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 |
| 8                    | -1                     | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  |
| 9                    | -1                     | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  |
| 10                   | 1                      | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  |

| Suite du tableau V |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 11                 | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  |
| 12                 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 |
| 13                 | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 |
| 14                 | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  |
| 15                 | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 |
| 16                 | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 |
| 17                 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  |
| 18                 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  |
| 19                 | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 |
| 20                 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 |
| 21                 | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

A – N : Symboles indiqués dans le tableau 6

Les valeurs observées de l'activité  $E_{24}$  sont les valeurs moyennes de quatre répétitions

L'effet principal de chaque variable est déterminé par l'équation suivante (Salam et al., 2013) :

$$E(xi) = 2(\Sigma (Mi^+ - Mi^-) / N$$

**E (xi)** : Effet de la variable testée.

**Mi<sup>+</sup>** : Réponse (production de biosurfactant) des essais auxquels la variable x est à ses niveaux élevés.

**Mi<sup>-</sup>** : Réponse (production de biosurfactant) des essais auxquels la variable x est à ses niveaux bas.

**N** : Nombre total d'essais.

L'erreur expérimentale est estimée en calculant la variance entre les deux variables fictives en utilisant l'équation suivante :

$$V_{eff} = \Sigma (Ed)^2 / n$$

**V<sub>eff</sub>** : Variance de l'effet.

**Ed** : Effet pour la variable factice.

**n** : Nombre de variables fictives utilisées dans l'expérience.

Les biosurfactants produits sont estimées par la mesure de l'indice d'émulsification à 24 heures ( $E_{42}$ ). Cet indice permet de quantifier la capacité du biosurfactant à stabiliser une émulsion entre une phase aqueuse et une phase huileuse, ce qui reflète son efficacité tensioactive.

Pour l'analyse statistique, l'erreur standard (SE) associée à l'effet d'une variable est calculée comme la racine carrée de la variance de l'effet ( $V_{eff}$ ). La significativité de l'effet de

chaque variable sur la production de biosurfactant est ensuite évaluée à l'aide du test de Student (t-test), selon l'équation suivante :

$$t(X_i) = E(X_i)/SE$$

**E (Xi)** : Effet de la variable Xi.

**SE** : Erreur standard.

## XII.2. Méthodologie de surface de réponse (RSM)

La méthodologie de surface de réponse et la courbe de contour sont utilisées pour la conception expérimentale et le processus d'optimisation (Montgomery, 2002 ; Calado et Montgomery, 2003 ; Rodrigues et Lemma, 2009).

Dans cette étape suivante de la formulation du milieu, la RSM est expliqué en utilisant une conception composite centrale (CCD), adoptée pour déterminer les niveaux optimaux de variables significatives criblées par la conception de Plackett-Burman qui ont considérablement influencé la production du biosurfactant BLA 2906.

Les trois niveaux des sept variables sont décrits comme dans le tableau VI. Les sept variables indépendantes sont évaluées à trois niveaux (-1, 0, +1) avec 80 essais expérimentaux et quatre points centraux répétitifs (tableau VII).

Les expériences sont menées dans des flacons erlenmeyer de 250 ml avec 100 ml de milieu, incubés à 30 °C pendant 72 h, préparés selon la conception.

**Tableau VI:** Niveaux de variables testés dans RSM.

| Variables                     | Symboles       | Niveaux |      |     |
|-------------------------------|----------------|---------|------|-----|
|                               |                | -1      | 0    | 1   |
| NaCl (g/L)                    | X <sub>1</sub> | 2       | 3    | 4   |
| CaCl <sub>2</sub> (g/L)       | X <sub>2</sub> | 0,02    | 0,06 | 0,1 |
| Glucose (g/L)                 | X <sub>3</sub> | 5       | 10   | 15  |
| Déchet d'huile (g/L)          | X <sub>4</sub> | 5       | 10   | 15  |
| pH                            | X <sub>5</sub> | 6       | 7    | 8   |
| Température d'incubation (°C) | X <sub>6</sub> | 30      | 33   | 36  |
| Agitation (rpm)               | X <sub>7</sub> | 100     | 150  | 200 |

Le modèle du second ordre utilisé pour ajuster la réponse aux variables indépendantes est montré dans l'équation suivante :

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

**Y** : Réponse prédite (production de biosurfactant).

**X<sub>i</sub>, X<sub>j</sub>** : Variables d'entrée qui influencent la réponse Y.

**K** : Nombre de variables.

**β<sub>0</sub>** : Terme constant.

**β<sub>i</sub>** : ième coefficient linéaire.

**β<sub>ii</sub>** : ième coefficient quadratique.

**β<sub>ij</sub>** : i, j : ième coefficient d'interaction.

Les interactions de sept variables sélectionnées sont déterminées en fonction d'activité d'émulsification (E<sub>24</sub>) (réponse). Les valeurs de réponse (Y) dans chaque essai sont la moyenne calculée en triples (tableau VII).

**Tableau VII:** Exécutions des variables du plan composite central (CCD).

| Ordre | Configuration | Variables Expérimentales |                |                |                |                |                |                |
|-------|---------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|       |               | X <sub>1</sub>           | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | X <sub>7</sub> |
| 1     | -----         | 2                        | 0,02           | 5              | 5              | 6              | 30             | 100            |
| 2     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 5              | 6              | 36             | 200            |
| 3     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 5              | 8              | 30             | 200            |
| 4     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 5              | 8              | 36             | 100            |
| 5     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 15             | 6              | 30             | 200            |
| 6     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 15             | 6              | 36             | 100            |
| 7     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 15             | 8              | 30             | 100            |
| 8     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 15             | 8              | 36             | 200            |
| 9     | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 5              | 6              | 30             | 200            |
| 10    | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 5              | 6              | 36             | 100            |
| 11    | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 5              | 8              | 30             | 100            |
| 12    | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 5              | 8              | 36             | 200            |
| 13    | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 15             | 6              | 30             | 100            |
| 14    | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 15             | 6              | 36             | 200            |
| 15    | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 15             | 8              | 30             | 200            |
| 16    | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 15             | 8              | 36             | 100            |
| 17    | -----+        | 2                        | 0,1            | 5              | 5              | 6              | 30             | 200            |
| 18    | -----+        | 2                        | 0,1            | 5              | 5              | 6              | 36             | 100            |
| 19    | -----+        | 2                        | 0,1            | 5              | 5              | 8              | 30             | 100            |
| 20    | -----+        | 2                        | 0,1            | 5              | 5              | 8              | 36             | 200            |
| 21    | -----+        | 2                        | 0,1            | 5              | 15             | 6              | 30             | 100            |
| 22    | -----+        | 2                        | 0,1            | 5              | 15             | 6              | 36             | 200            |
| 23    | -----+        | 2                        | 0,1            | 5              | 15             | 8              | 30             | 200            |
| 24    | -----+        | 2                        | 0,1            | 5              | 15             | 8              | 36             | 100            |

| Suite du tableau VII |            |   |      |    |    |   |    |     |
|----------------------|------------|---|------|----|----|---|----|-----|
| 25                   | ---+-----  | 2 | 0,1  | 15 | 5  | 6 | 30 | 100 |
| 26                   | ---+-----+ | 2 | 0,1  | 15 | 5  | 6 | 36 | 200 |
| 27                   | ---+++++   | 2 | 0,1  | 15 | 5  | 8 | 30 | 200 |
| 28                   | ---++++-   | 2 | 0,1  | 15 | 5  | 8 | 36 | 100 |
| 29                   | ---+++++   | 2 | 0,1  | 15 | 15 | 6 | 30 | 200 |
| 30                   | ---++++-   | 2 | 0,1  | 15 | 15 | 6 | 36 | 100 |
| 31                   | ---++++-   | 2 | 0,1  | 15 | 15 | 8 | 30 | 100 |
| 32                   | ---+++++   | 2 | 0,1  | 15 | 15 | 8 | 36 | 200 |
| 33                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 5  | 5  | 6 | 30 | 200 |
| 34                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 5  | 5  | 6 | 36 | 100 |
| 35                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 5  | 5  | 8 | 30 | 100 |
| 36                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 5  | 5  | 8 | 36 | 200 |
| 37                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 5  | 15 | 6 | 30 | 100 |
| 38                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 5  | 15 | 6 | 36 | 200 |
| 39                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 5  | 15 | 8 | 30 | 200 |
| 40                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 5  | 15 | 8 | 36 | 100 |
| 41                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 15 | 5  | 6 | 30 | 100 |
| 42                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 15 | 5  | 6 | 36 | 200 |
| 43                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 15 | 5  | 8 | 30 | 200 |
| 44                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 15 | 5  | 8 | 36 | 100 |
| 45                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 15 | 15 | 6 | 30 | 200 |
| 46                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 15 | 15 | 6 | 36 | 100 |
| 47                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 15 | 15 | 8 | 30 | 100 |
| 48                   | +-----+    | 4 | 0,02 | 15 | 15 | 8 | 36 | 200 |
| 49                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 5  | 5  | 6 | 30 | 100 |
| 50                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 5  | 5  | 6 | 36 | 200 |
| 51                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 5  | 5  | 8 | 30 | 200 |
| 52                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 5  | 5  | 8 | 36 | 100 |
| 53                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 5  | 15 | 6 | 30 | 200 |
| 54                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 5  | 15 | 6 | 36 | 100 |
| 55                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 5  | 15 | 8 | 30 | 100 |
| 56                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 5  | 15 | 8 | 36 | 200 |
| 57                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 15 | 5  | 6 | 30 | 200 |
| 58                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 15 | 5  | 6 | 36 | 100 |
| 59                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 15 | 5  | 8 | 30 | 100 |
| 60                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 15 | 5  | 8 | 36 | 200 |
| 61                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 15 | 15 | 6 | 30 | 100 |
| 62                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 15 | 15 | 6 | 36 | 200 |
| 63                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 15 | 15 | 8 | 30 | 200 |
| 64                   | +-----+    | 4 | 0,1  | 15 | 15 | 8 | 36 | 100 |
| 65                   | a000000    | 2 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 |
| 66                   | A000000    | 4 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 |
| 67                   | 0a00000    | 3 | 0,02 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 |
| 68                   | 0A00000    | 3 | 0,1  | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 |
| 69                   | 00a0000    | 3 | 0,06 | 5  | 10 | 7 | 33 | 150 |

| Suite du tableau VII |         |   |      |    |    |   |    |     |
|----------------------|---------|---|------|----|----|---|----|-----|
| 70                   | 00A0000 | 3 | 0,06 | 15 | 10 | 7 | 33 | 150 |
| 71                   | 000a000 | 3 | 0,06 | 10 | 5  | 7 | 33 | 150 |
| 72                   | 000A000 | 3 | 0,06 | 10 | 15 | 7 | 33 | 150 |
| 73                   | 0000a00 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 6 | 33 | 150 |
| 74                   | 0000A00 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 8 | 33 | 150 |
| 75                   | 00000a0 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 30 | 150 |
| 76                   | 00000A0 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 36 | 150 |
| 77                   | 000000a | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 100 |
| 78                   | 000000A | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 200 |
| 79                   | 0000000 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 |
| 80                   | 0000000 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 |

Les tracés graphiques tridimensionnels obtenus par le JMP (Version 15.2.1, SAS) illustrent les interactions mutuelles entre chaque facteur significatif, évaluant ainsi les composantes optimisées du milieu. L'analyse de variance (ANOVA) est menée pour déterminer la validité du modèle et des coefficients de régression. La qualité de l'équation polynomiale est jugée par le coefficient de détermination ( $R^2$ ) et sa signification statistique est vérifiée par le test F de Fischer. La signification des coefficients de régression est testée par le test t de Student. La surface de réponse et les courbes de niveau des réponses prédites par le modèle sont utilisées pour évaluer les relations interactives entre les variables significatives.

### XIII. Analyses statistiques

Les données de toutes les expériences sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type (ET) pour trois répétitions. Le logiciel Statistica (version 5.1) est utilisé pour effectuer l'analyse statistique des données à l'aide du test de Student pour déterminer les différences significatives entre le biosurfactant brut et le témoin. Les différences sont considérées comme statistiquement significatives à  $p < 0,05$ . Le produit MacIntosh de John (version 15.2.1., SAS, Cary, NC, USA) et les progiciels Design-Expert sont utilisés pour construire les plans de Box-Behnken (BBD) et Composite Central (CCD).

## *Chapitre II :*

### *Résultats et discussion*

## Chapitre II: Résultats et discussions

### I. Capacité de production de biosurfactant

Les résultats obtenus des paramètres utilisés pour déterminer la production potentielle de biosurfactant par la souche isolée *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 sont regroupés dans le tableau VIII.

**Tableau VIII:** Paramètres de production du Biosurfactant BLA 2906.

| Tests                                        | Résultats    |              |                     |
|----------------------------------------------|--------------|--------------|---------------------|
|                                              | BLA 2906     | SDS          | Culture acellulaire |
| Activité hémolytique                         | -            | /            | -                   |
| Activité émulsifiante (E <sub>24</sub> ) (%) | 63,11 ± 1,32 | 61,57 ± 1,21 | <40,1 ± 0,92        |
| Déplacement d'huile (mm)                     | 23,67 ± 0,02 | 50 ± 0,89    | 5 ± 0,43            |
| Drop collapse                                | +            | -            | -                   |

- : Test négatif ; + : Test positif ; / : Pas fait ; SDS : Sodium Dodécyl sulfate

#### I.1. Activité hémolytique

La lyse des globules rouges de mouton est recommandée comme méthode simple et facile pour tester l'activité hémolytique des biosurfactants (Yonebayashi et al., 2000). Aucune hémolyse n'est observée en utilisant ce test sur BLA 2906 (Tableau VIII, Figure 20).



**Figure 20 :** Photographie de l'activité hémolytique négative de biosurfactant BLA 2906.

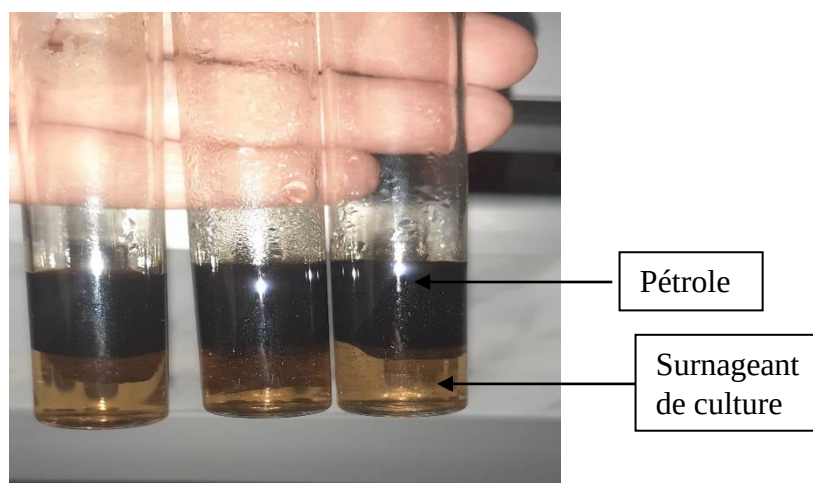
Cela signifie que ce biosurfactant ne provoque pas la lyse des membranes des globules rouges, ce qui est essentiel dans les applications médicales où l'intégrité des cellules est primordiale. Ce résultat est similaire à celui rapporté par Das et al. (2008a) avec le biosurfactant produit par la souche marine de *Bacillus circulans*.

L'activité hémolytique apparaît comme un bon critère de criblage pour les souches productrices de tensioactifs (Carrillo et al., 1996). Elle est utilisée pour l'isolement des biosurfactants lipopeptidiques (Walter et al., 2010).

Les biosurfactants non hémolytiques présentent un potentiel important pour des applications médicales et pharmaceutiques (traitements des infections cutanées et amélioration de la régénération tissulaire) (Banat et al., 2000 ; Symmank et al., 2002 ; Raza et al., 2020).

### I.2. Activité émulsifiante (E<sub>24</sub>)

L'indice d'émulsification (E<sub>24</sub>) du surnageant de culture pour la souche isolée *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 s'est avéré très intéressant (Tableau VIII, Figure 21). Sa valeur est de 63,11 % et elle est supérieure à celle de SDS (contrôle positif).



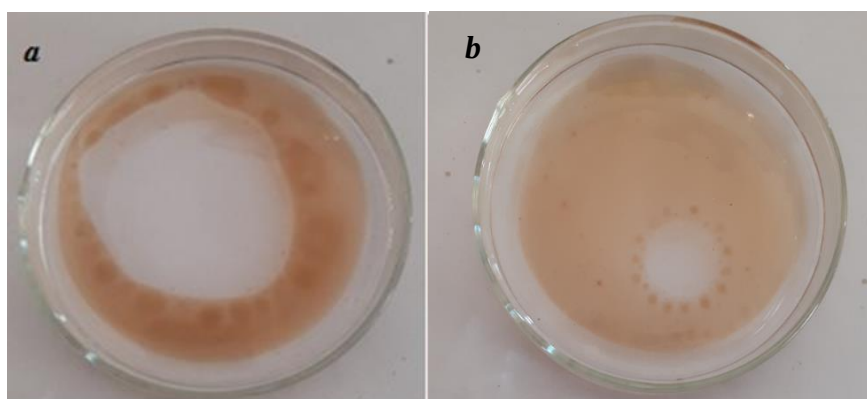
**Figure 21** : Photographie du test d'émulsification (E<sub>24</sub>).

L'activité émulsifiante est assez appréciable et elle est dans l'intervalle obtenu par Maalej et al. (2016). Ils ont constaté que les valeurs de cet indice varient de 42,5 à 89 % en utilisant les différents hydrocarbures pour *Pseudomonas stutzeri*.

De même, cette activité est également presque similaire par rapport à la valeur obtenue par Kuyukina et Ivshina (2010) où l'indice d'émulsification avec n-hexadécane est de 62 % (De Sousa et Bhosle, 2012). De plus, les lipopeptides purifiés de *Pseudomonas* tels que la viscosine, le massétolide A, la putisolvine, l'amphisine (Bak et al., 2015) et les pseudofactines se sont révélés être de bons émulsifiants par rapport à n-hexadécane (Janek et al., 2010).

### I.3. Déplacement d'huile

Une activité de surface élevée du biosurfactant est indiquée par un grand diamètre du déplacement d'huile. Le surnageant de la souche isolée *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 a donné un diamètre de  $23,66 \pm 0,57$  mm, ce qui reflète la présence de concentrations élevées de composés tensioactifs. Par contre, le contrôle positif, qui est le SDS, présente un diamètre de 50 mm (Tableau VIII, Figure 22). La présence d'une zone claire à la surface de l'huile confirme la présence de biosurfactant.



**Figure 22 :** Diamètre de déplacement du pétrole brut.

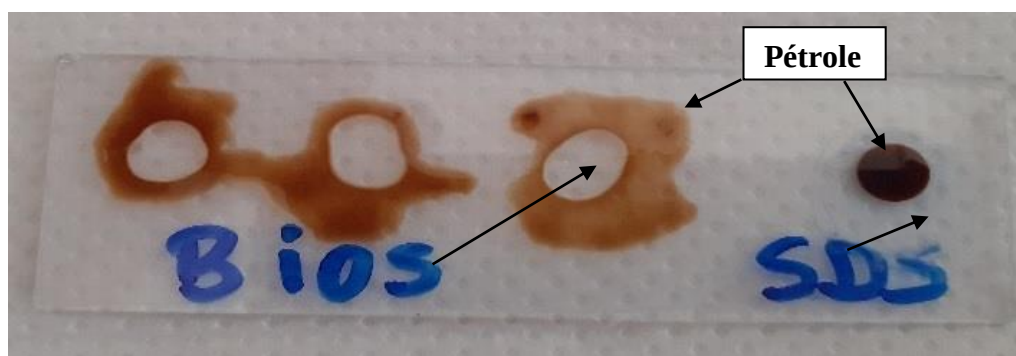
(a) SDS, (b) biosurfactant BLA 2906.

En comparant nos résultats avec la littérature, les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* atteignent généralement des diamètres de 50 à 60 mm (Abdel-Mawgoud et al., 2010), la surfactine de *Bacillus subtilis* entre 40 et 45 mm (Yalçın et al., 2018), et les sophorolipides de *Candida bombicola* environ 32 mm (Joshi et al., 2008).

La production microbienne d'agents tensioactifs se développant sur du pétrole brut et d'autres substances hydrophobes est fréquemment rapportée (Kumar et al., 2006). Morikawa et al. (2000) ont montré que la zone de déplacement par une solution contenant un tensioactif est directement proportionnelle à la concentration des biosurfactants testés. Le diamètre de la zone claire augmente linéairement avec la concentration de biosurfactant.

### I.4. Effondrement de la goutte

Le résultat du test d'effondrement de la goutte, réalisé avec du pétrole, sur une lame en verre a montré une réaction positive (++) entre la goutte de culture contenant un surfactant et la surface du pétrole. Il y a aplatissement de sa surface (Figure 23).



**Figure 23 :** Photographie du test d'effondrement de goutte.

Bios : Biosurfactant, SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

Un étalement complet est observé en raison de la réduction de la tension superficielle entre la goutte de liquide et la surface hydrophobe alors qu'avec une culture sans biosurfactant, les gouttes sont restées stables. En plus, les gouttelettes s'effondrent en raison d'une réduction de la tension interfaciale entre l'eau et l'huile. Ce résultat est confirmé aussi par les travaux de [Banat \(1995\)](#) et [Walter et.al. \(2010\)](#).

L'étude effectuée par [Patowary et al. \(2015\)](#) ont montré que les cinq bouillons de culture de 12 isolats bactériens ont pu réduire la goutte d'huile brute, indiquant la présence de biosurfactant dans le milieu de bouillon de culture respectif. L'effondrement des gouttes, lorsqu'il est observé, se produit toujours dans la minute qui suit l'ajout du bouillon de culture, les bouillons de culture bactériennes restants sont incapables de réduire la goutte de pétrole brut même après 1 min.

## II. Poids sec

Le résultat de la production de biosurfactant par la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 a donné un poids sec de  $4,25 \pm 0,02$  g/L de BLA 2906. Des études ont montré que le rendement et le type du biosurfactant sont influencés par le milieu utilisé et les conditions de croissance. D'où l'optimisation de la production des biosurfactants est affectée par des paramètres nutritionnels et environnementaux ([Mulligan et al., 2014](#)).

## III. Profils biochimiques

### III.1. Teneurs en protéines, sucres et lipides

La teneur en protéines est de  $8,49 \pm 0,19$  %. Ce résultat confirme qu'une petite partie de ce biosurfactant BLA 2906 est de nature protéique. Quand la solution de biosurfactant est ajoutée à la solution de l'anthrone, il y a eu sa décoloration. Par contre, quand la solution du

glucose y est additionnée, il y a eu formation d'un anneau bleu vert au fond du tube. Cela confirme que le biosurfactant BLA 2906 ne contient pas des fractions glucidiques.

Ce biosurfactant présente un taux appréciable en lipides ( $52,66 \pm 1,16\%$ ). Ce résultat confirme la nature lipopeptidique du biosurfactant produit par la souche étudiée.

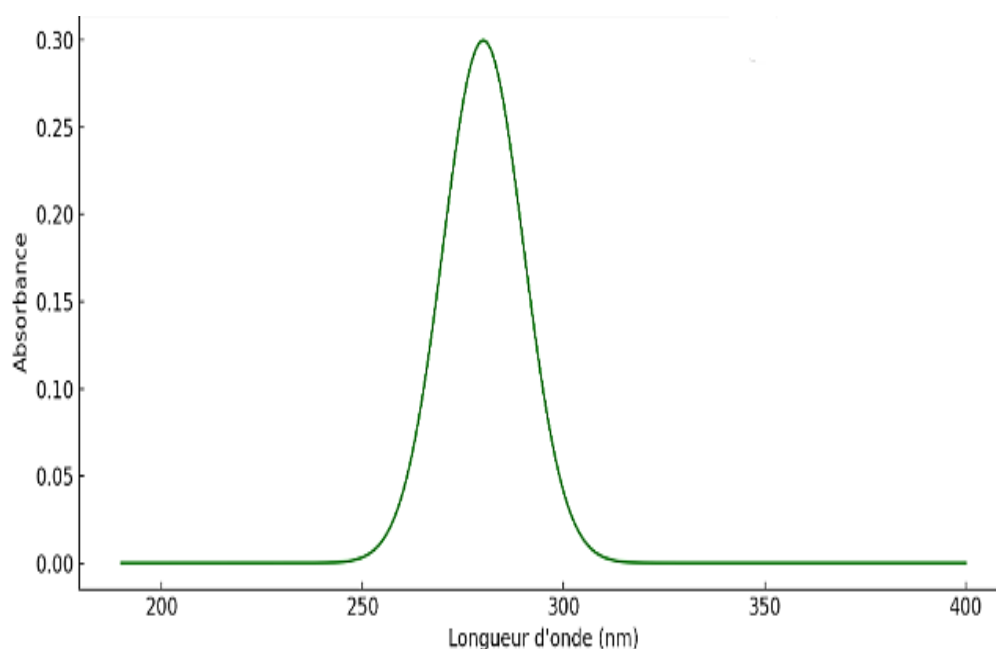
L'estimation des protéines, des glucides et des lipides du biosurfactant BLA 2906 produit par la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 a permis de le classer comme lipopeptide.

### III.2. Spectre UV

La figure 24 montre le spectre UV (190 – 400 nm) du biosurfactant BLA 2906.

Le spectre UV de l'échantillon présente un pic d'absorbance marqué à 280 nm, caractéristique des groupes aromatiques tels que le tryptophane ou la tyrosine. Ce signal confirme la présence de composé peptidique contenant des cycles aromatiques.

Ce spectre constitue donc un indicateur pertinent pour l'identification et la quantification des lipopeptides dans des échantillons biologiques. La présence d'un tel pic suggère que le composé possède une structure peptidique bien définie, avec au moins un acide aminé aromatique dans sa séquence. Donc, le biosurfactant BLA 2906 a une partie protéique qui absorbe à 280 nm.



**Figure 24 :** Spectre UV de biosurfactant.

### III.3. Chromatographie sur couche mince

Cette technique a mis en évidence deux taches rosées après pulvérisation au réactif à la ninhydrine, révélant la présence de groupements aminés et suggérant que le biosurfactant contient des fragments peptidiques (Figure 25).



**Figure 25 :** Séparation de biosurfactant BLA 2906 sur CCM.

**Rf<sub>1</sub> et Rf<sub>2</sub> :** Rapports frontaux. **a** :Après pulvérisation avec la ninhydrine ; **b** : après pulvérisation a l'anthrone.

Les taches apparaissent à des valeurs de  $Rf_1 = 0,54$  et  $Rf_2 = 0,75$ . Ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle BLA 2906 est un biosurfactant de nature lipopeptidique. Des valeurs similaires sont rapportées pour la surfactine, utilisée comme standard de référence (Fernandes et al., 2007). De plus, un profil chromatographique comparable est observé par Das et al. (2008a), lors de l'étude d'un biosurfactant lipopeptidique produit par *Bacillus circulans*, ce qui renforce la fiabilité de cette caractérisation.

Des résultats similaires ont été rapportés par [Sriram et al., \(2011\)](#), qui ont caractérisé un biosurfactant brut extrait après précipitation acide à l'aide de la CCM. Leur analyse a révélé deux taches visibles sous lumière UV, avec des valeurs de  $R_f$  de 0,52 et 0,69, ce qui est comparable aux observations faites pour BLA 2906.

En revanche, [Bezza et Chirwa \(2015\)](#) ont observé après pulvérisation au réactif à la ninhydrine une tache rose avec un  $R_f$  de 0,62, indiquant également la présence d'acides aminés mais suggérant une structure moins complexe que celle de BLA 2906.

Aucune tache n'a été observée après pulvérisation au réactif à l'antrone, ce qui confirme l'absence de fractions glucidiques dans l'échantillon de biosurfactant BLA 2906. Ce résultat suggère que le composé ne contient pas de structure glycolipidique, ce qui oriente encore davantage la structure vers une nature lipopeptidique.

#### III.4. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

L'utilisation de FTIR pour l'étude de biosurfactant a donné un spectre FTIR avec des bandes d'absorption qui s'étalent entre 4000 et 500  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 26).

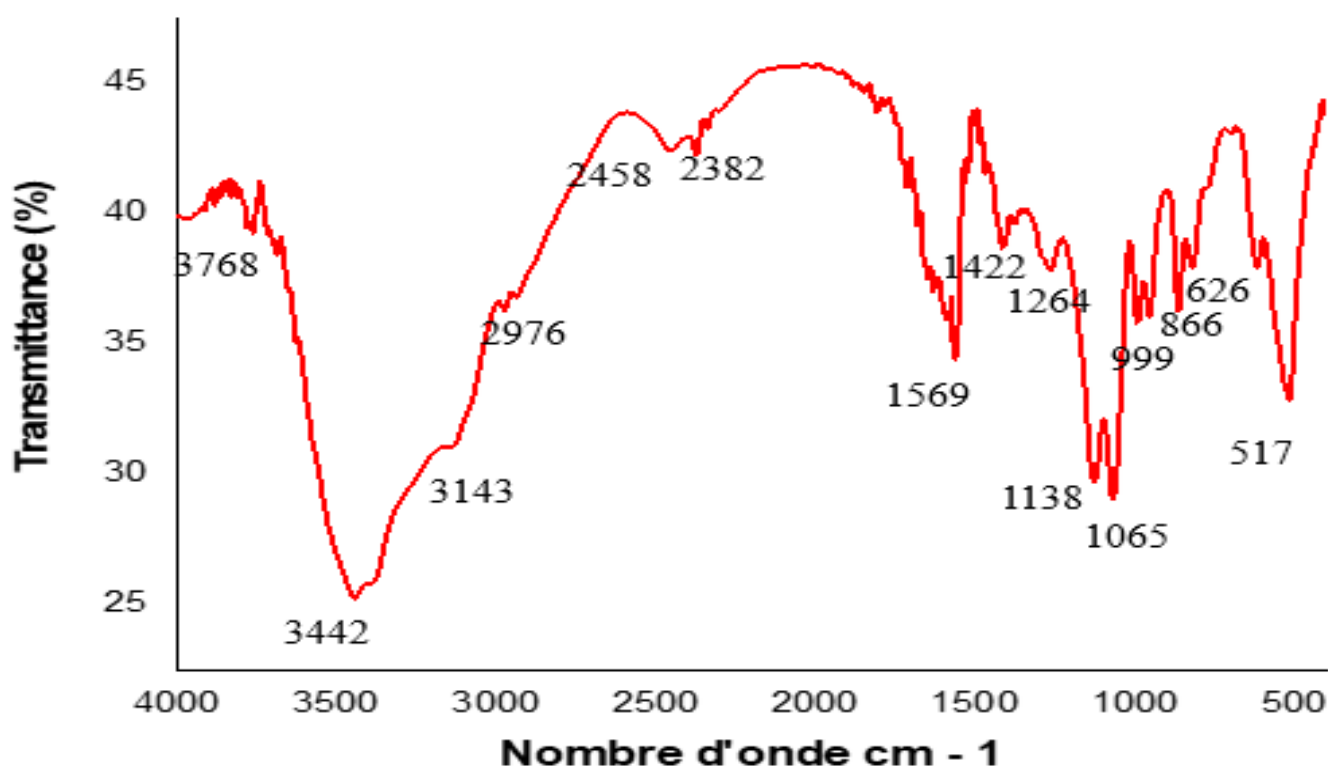


Figure 26 : Spectre FTIR de biosurfactant BLA 2906.

Les pics du spectre FTIR correspondent à différents groupes fonctionnels (Annexe 3). Le pic à  $3768\text{ cm}^{-1}$  est associé aux vibrations O-H des groupes hydroxyles dans la portion lipidique, tandis que celui à  $3442\text{ cm}^{-1}$  correspond aux groupes amides (N-H) dans la portion peptidique. Le pic à  $3143\text{ cm}^{-1}$  pourrait être lié à des vibrations N-H dans les amines secondaires ou à des C-H dans la partie lipidique.

Les pics à  $2976\text{ cm}^{-1}$  et  $1422\text{ cm}^{-1}$  sont caractéristiques des vibrations C-H dans les chaînes aliphatiques des acides gras. Les pics à  $2458\text{ cm}^{-1}$  et  $2382\text{ cm}^{-1}$  sont attribués aux groupes nitriles ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ).

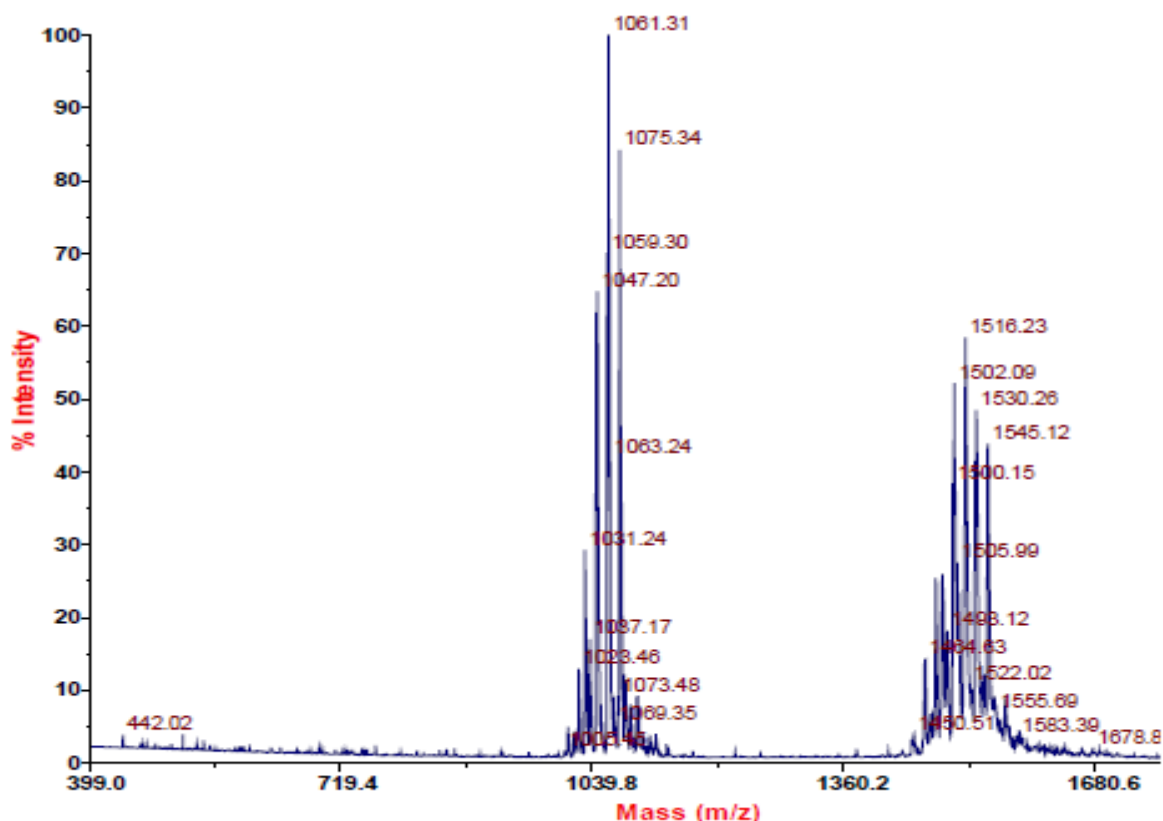
Le pic à  $1569\text{ cm}^{-1}$  correspond à la fonction l'amide (déformation N-H et étirement C-N), spécifique des liaisons peptidiques. D'autres pics à  $1138\text{ cm}^{-1}$ ,  $1065\text{ cm}^{-1}$ , et  $999\text{ cm}^{-1}$  sont associés à des vibrations C-O et C-N, représentant des groupes fonctionnels dans les portions lipidiques et peptidiques. Les pics à  $866\text{ cm}^{-1}$ ,  $626\text{ cm}^{-1}$ , et  $517\text{ cm}^{-1}$  sont liés à des déformations C-H dans les chaînes lipidiques (vibrations où les liaisons carbone-hydrogène (C-H) subissent des changements dans leur angle ou leur orientation, sans changer la distance entre les atomes de carbone et d'hydrogène).

Ces observations confirment la nature lipopeptidique du biosurfactant, avec des groupes amide, aliphatique (linéaire, ramifié ou cyclique mais non aromatique) et hydroxyle, en accord avec l'échantillon de surfactine standard (Silverstein et Bassler, 1962 ; Barth et Zscherp, 2002 ; Sriram et al., 2011 ; Colthup, 2012 ; Sousa et al., 2014).

Les résultats présentent une similitude à ceux observés par Yalaoui-Guellal et al. (2020). En effet, les biosurfactants issus des souches de *Rhodococcus ruber*, *d'Alcaligenes faecalis* et de *Cellulosi microbium* ont donné trois spectres FTIR identiques avec des bandes d'absorption qui varient entre  $4000$  et  $400\text{ cm}^{-1}$ . Le spectre FTIR de la surfactine standard mentionné par Sivapathasekaran et al. (2010) a présenté également une similitude étroite avec les spectres IR des autres biosurfactants lipopeptides produits par *Bacillus sp.* (Mukherjee et al., 2008).

### III.5. Caractérisation de biosurfactant BLA 2906 par MALDI-TOF-MS

Les résultats de la spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS sont présentés dans la figure 27. Deux plages de pics principales sont identifiées :  $1008$  à  $1105$  et  $1450$  à  $1585$ . Ces pics sont typiques des surfactines, des iturines et des fengycines. Les pics majeurs de ces plages et leurs attributions potentielles aux lipopeptides sont présentés dans le tableau IX (Dimkić et al., 2017).



**Figure 27 :** Spectre MALDI-TOF/MS du lipopeptide BLA 2906.

**Tableau IX:** Identification des lipopeptides à l'aide de la spectrométrie MALDI-TOF/MS.

| Masse          | Attribution des lipopeptides | Références                  |
|----------------|------------------------------|-----------------------------|
| <b>1047,20</b> | C13 Surfactine (M+ K)+       | (Dimkić et al., 2017)       |
| <b>1061,31</b> | C14 Surfactine (M + K)+      | Proposée                    |
| <b>1075,34</b> | C15 Surfactine (M + K)+      | (Dimkić et al., 2017)       |
| <b>1464,45</b> | C16 Fengycine A (M + H)+     | Basée sur une analyse MS/MS |
| <b>1478,73</b> | C17 Fengycine A (M + H)+     | Basée sur une analyse MS/MS |
| <b>1493,03</b> | C18 Fengycine B (M + H)+     | Basée sur une analyse MS/MS |
| <b>1505,98</b> | C19 Fengycine B (M + H)+     | Basée sur une analyse MS/MS |

Ce tableau présente les structures de masse 1047, 1061 et 1075, typiques des surfactines contenant respectivement 13, 14 et 15 atomes de carbone. Il présente également les structures massiques 1464, 1478, 1493 et 1505, qui peuvent représenter différents tensioactifs de type fengycine, d'après leur analyse MS/MS, qui a généré la décomposition de la structure moléculaire attendue pour ces types de molécules, comme détaillé ci-dessous.

Deux familles principales de lipopeptides sont détectées :

- Surfactines : lipopeptides cycliques connus pour leur activité tensioactive et antimicrobienne.
- Fengycines : également cycliques, mais avec une structure différente, surtout antifongique.

La chaîne lipidique (C13–C19) varie, influençant les propriétés physico-chimiques et biologiques des lipopeptides. Les formes ionisées observées sont soit (M+K)<sup>+</sup> (ajout d'un ion potassium), soit (M+H)<sup>+</sup> (ajout d'un proton), ce qui est typique des analyses en spectrométrie de masse en mode positif. Les attributions sont validées par des analyses MS/MS (spectrométrie de masse en tandem), permettant de confirmer la structure par fragmentation.

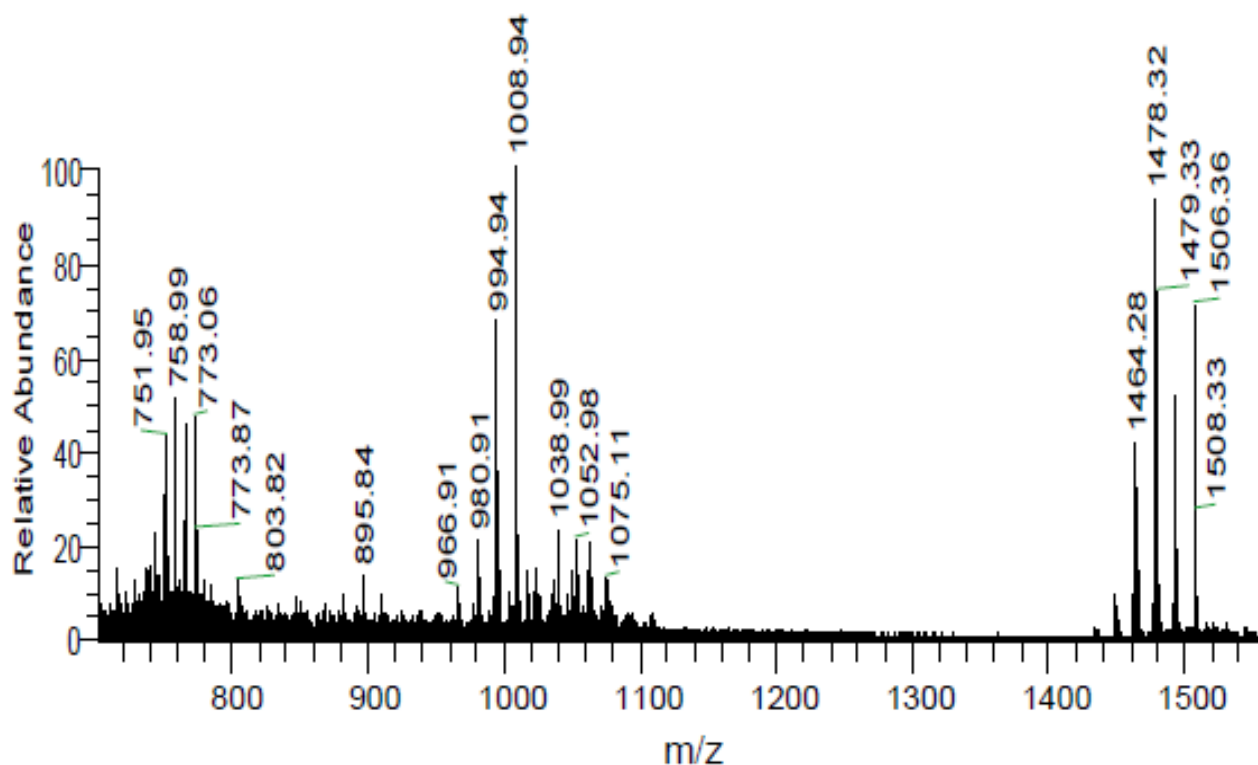
### III.5. Caractérisation de biosurfactant BLA 2906 par HPLC-MS/MS

Suite aux résultats de la spectrométrie de masse MALDI-TOF, une caractérisation plus poussée est réalisée par HPLC-MS afin de séparer les différentes espèces. L'analyse ESI-MS complète est présentée dans la figure 28 et présente deux profils de pics distincts, similaires à ceux observés en MALDI-TOF/MS, avec des pics supplémentaires à 751-773, correspondant aux pics doublement chargés 1464-1506, dont le K<sup>+</sup> est proposé. Les résultats de la spectrométrie de masse HPLC-MS sont présentés dans le tableau X (Affectation des lipopeptides par HPLC/MS et leur abondance relative individuelle en fonction de leur classe) (Ma et al., 2016).

**Tableau X:** Identification des lipopeptides par chromatographie HPLC couplée à la spectrométrie de masse.

| m/z  | Temps de rétention | Abondance relative | Affectation des lipopeptides         |
|------|--------------------|--------------------|--------------------------------------|
| 994  | 36,52              | 36,53              | C12 Surfactine (M + H) <sup>+</sup>  |
| 1008 | 39,44              | 63,47              | C13 Surfactine (M + H) <sup>+</sup>  |
| 1464 | 15,05              | 14,84              | C16 fengycine A (M + H) <sup>+</sup> |
| 1478 | 16,07              | 35,53              | C17 fengycine A (M + H) <sup>+</sup> |
| 1492 | 15,79              | 20,13              | C16 fengycine B (M + H) <sup>+</sup> |
| 1506 | 16,99              | 29,50              | C17 fengycine B (M + H) <sup>+</sup> |

Lipopeptide #390-2240 RT: 6.92-41.20 AV: 1851 NL: 3.29E5  
F: + c ESI Full ms [ 100.00-2000.00]



**Figure 28 :** Spectre global en ionisation électrospray (ESI) du lipopeptide BLA 2906.

D'autres pics ont également été identifiés, mais ils présentent une série de fractions contaminantes qui n'ont pas pu être résolues et ne sont donc pas présentées dans le tableau X. Pour caractériser plus précisément les lipopeptides, une autre analyse HPLC-MS est réalisée avec un paramètre supplémentaire permettant de caractériser tous les pics pertinents (Figure 29) par MS/MS et de caractériser plus précisément les produits MS/MS pertinents par MS3 avec une énergie de dissociation de 35. À l'énergie de collision utilisée, seuls les pics 1464, 1478, 1492 et 1506 ont donné des valeurs qui peuvent être caractérisées plus en détail (Figure 30).

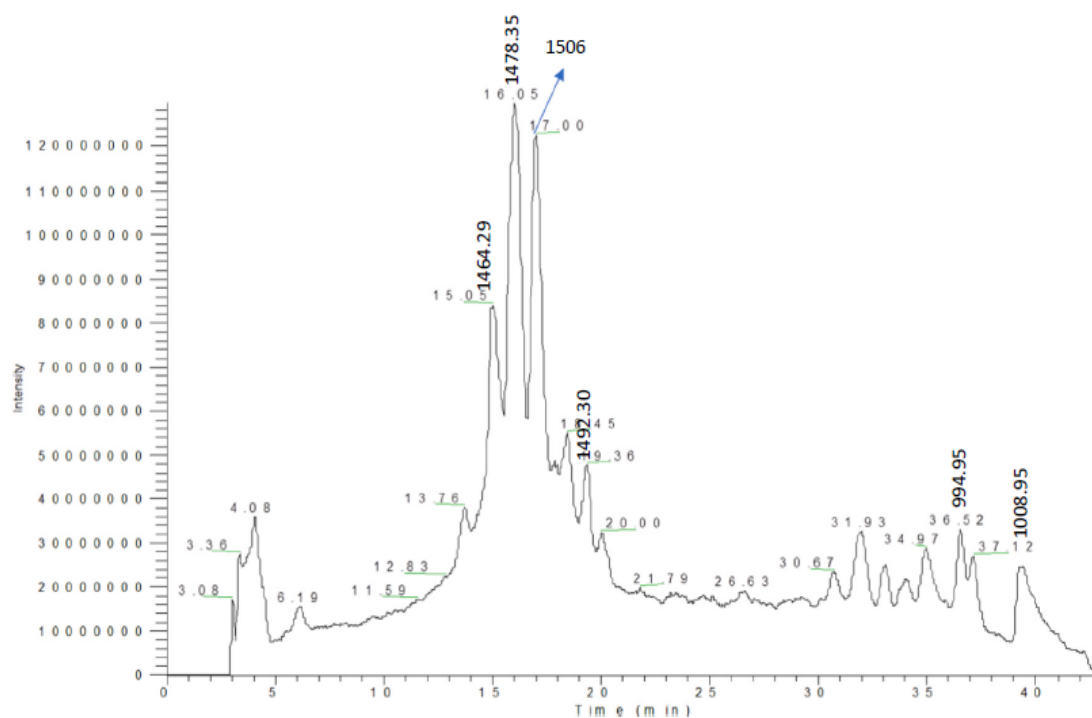


Figure 29 : Chromatogramme du biosurfactant BLA 2906.

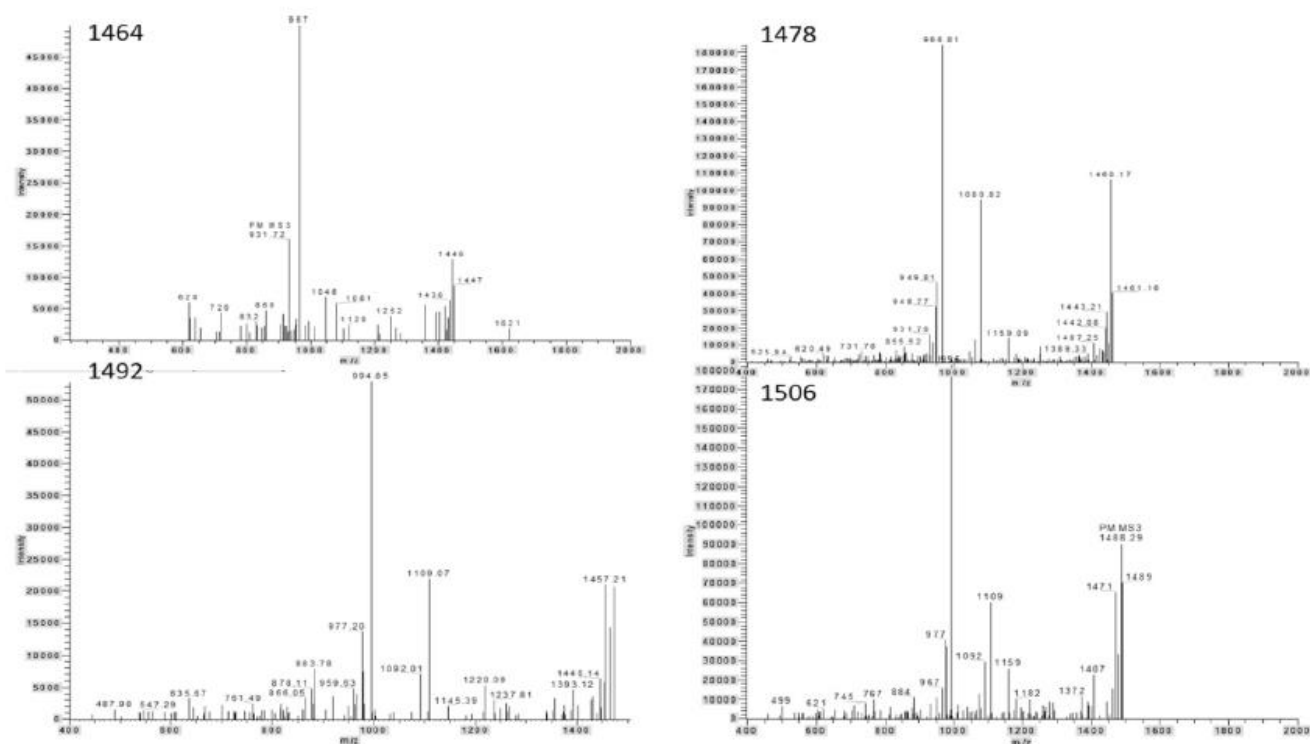
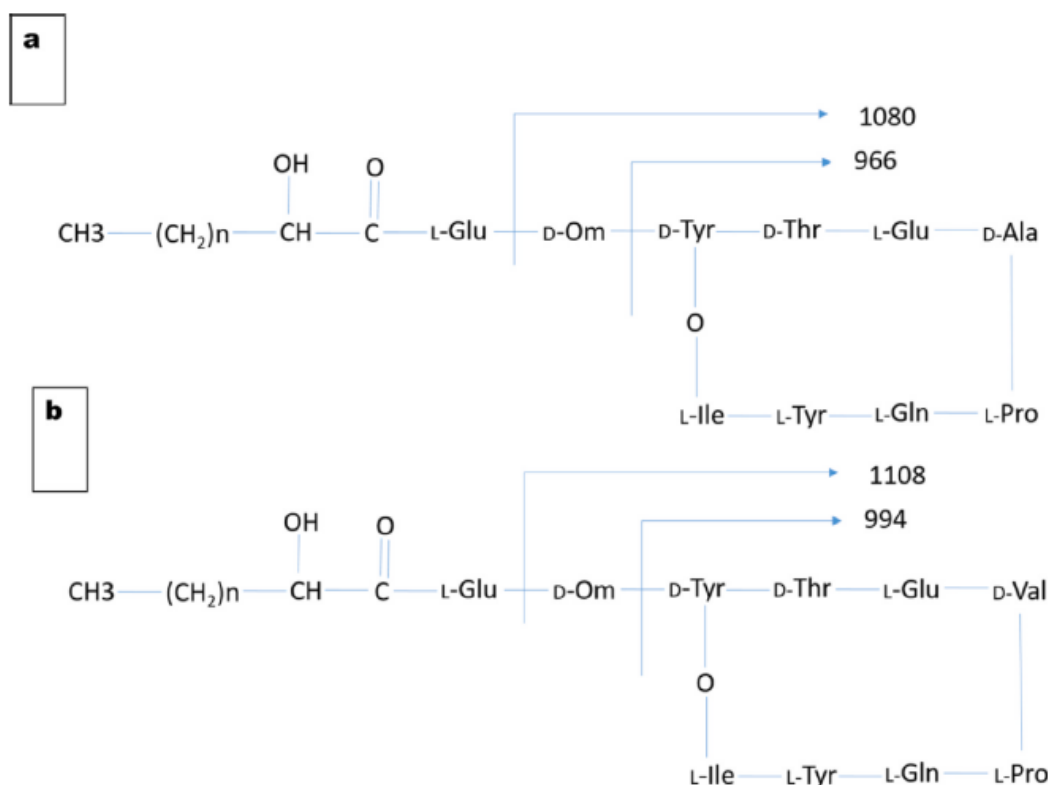


Figure 30 : Identification de BLA 2906 par chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Ces pics probablement correspondent à la fengycine A ( $M + H$ )<sup>+</sup> en C16 à C19. Cependant, la dissociation induite par collision (CID) a montré que les composés 1464 et 1478 ont des ions filles en 966 et 1080, tandis que les composés 1492 et 1506 possèdent des ions filles en 994 et 1108. Ces derniers indiquent la fengycine A ( $M + H$ )<sup>+</sup> en C16 et C17 avec D-Ala en position 6, tandis que les premiers indiquent la fengycine B ( $M + H$ )<sup>+</sup> en C16 et C17 avec D-Val en position 6 (Figure 31 a et b) (Pecci et al., 2010).



**Figure 31 :** Structures de la fengycine.

**a** Fengycine A, **b** Fengycine B

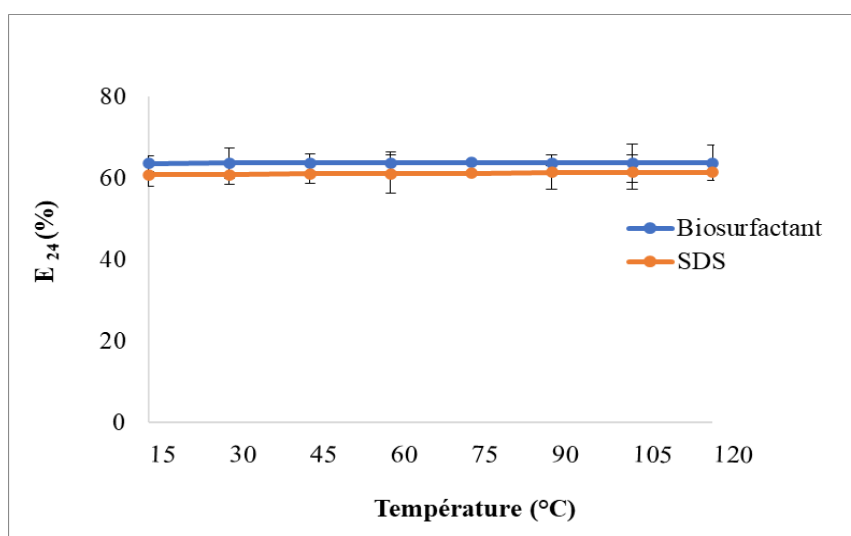
#### IV. Paramètres de stabilité

La stabilité des biosurfactants dans différentes conditions de milieu de culture telles que la température, le pH et la salinité est un facteur important à étudier car elle affecte directement leur applicabilité. Les valeurs d'indice d'émulsification du biosurfactant BLA 2906 sont mesurées à différentes températures, pH et concentrations de NaCl.

### IV.1. Effet de la température

L'activité d'émulsification maximale est atteinte presque sur toute la gamme choisie. Le biosurfactant BLA 2906 est thermostable car il a conservé son activité d'émulsification après un traitement de 1 h à différents températures (Figure 32).

Comparé au SDS (dodécylsulfate de sodium), son activité demeure légèrement supérieure à toutes les températures évaluées.



**Figure 32 :** Stabilité thermique de biosurfactant BLA 2906 et SDS.

Les barres verticales représentent l'écart type de trois déterminations.

Les travaux de [Obayori et al. \(2009\)](#) ont montré que la rétention de plus de 60 % d'activité d'émulsification à 10 et 100 °C suggère que le biosurfactant produit par *Trichosporon asahii* pourrait être utile dans les systèmes industriels où les températures extrêmes font partie intégrante.

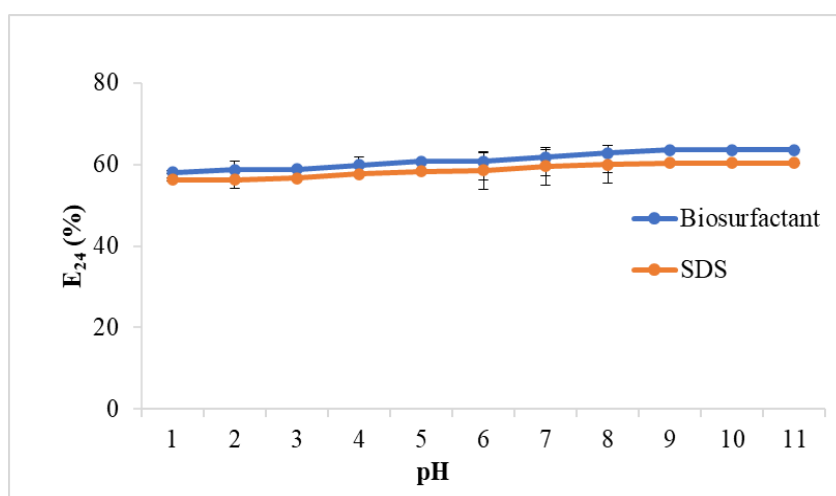
[De Sousa et Bhosle \(2012\)](#) ont montré une bonne activité réductrice de tension superficielle et émulsifiante jusqu'à 80 °C ou 100 °C pour les biosurfactants lipopeptidiques produits par *Pseudomonas nitroreducens* TSB.MJ10, *Bacillus subtilis* DM-03 et DM-04 ([Mukherjee, 2008](#)) et *Serratia marcescens* NSK-1 ([Anyanwu et al., 2011](#)).

Les rhamnolipides conservent de bonnes activités réductrices de tension superficielle et émulsifiantes jusqu'à 121 °C ([Abdel-Mawgoud et al., 2009](#) ; [Aparna et al., 2012](#)). Le chauffage du surnageant de la souche *Pseudomonas aeruginosa* à 125 °C pendant une heure

n'a pas eu d'effet significatif sur ses performances. Une telle stabilité à des températures extrêmes est observée par la souche *Brevibacterium aureum* MSA 13 qui a produit un biosurfactant lipopeptidique (Abdel-Mawgoud et al., 2009).

#### IV.2. Effet du pH

La stabilité du biosurfactant BLA 2906 a montré un profil d'activité d'émulsification presque stable sur une large gamme de valeurs de pH (1 à 11). Le SDS présente une activité un peu moindre par rapport au biosurfactant étudié (Figure 33).



**Figure 33 :** Effet du pH sur E<sub>24</sub> de biosurfactant BLA 2906 et SDS.

Les barres verticales représentent l'écart type de trois déterminations

Obayori et al. (2009) ont montré que le biosurfactant produit par la bactérie *Pseudomonas sp.* pourrait être utile dans des conditions environnementales acides et alcalines car il peut conserver son activité sur une large gamme de pH.

Une diminution de l'activité émulsifiante à pH acide et alcalin est observée par De Sousa et Bhosle (2012) concernant la stabilité des biosurfactants lipopeptidiques (Anyanwu et al., 2011). La perte de stabilité à faible pH (<5) est probablement due à la survenue de précipitations, provoquées par l'insolubilité consécutive de biosurfactant produit par *Pseudomonas aeruginosa* à ces valeurs (Makkar et Cameotra, 1997). Il est rapporté que lorsque le pH augmente de 5 à 8, la charge négative de la tête polaire augmente, favorisant une augmentation de la solubilité aqueuse (Abdel-Mawgoud et al., 2009).

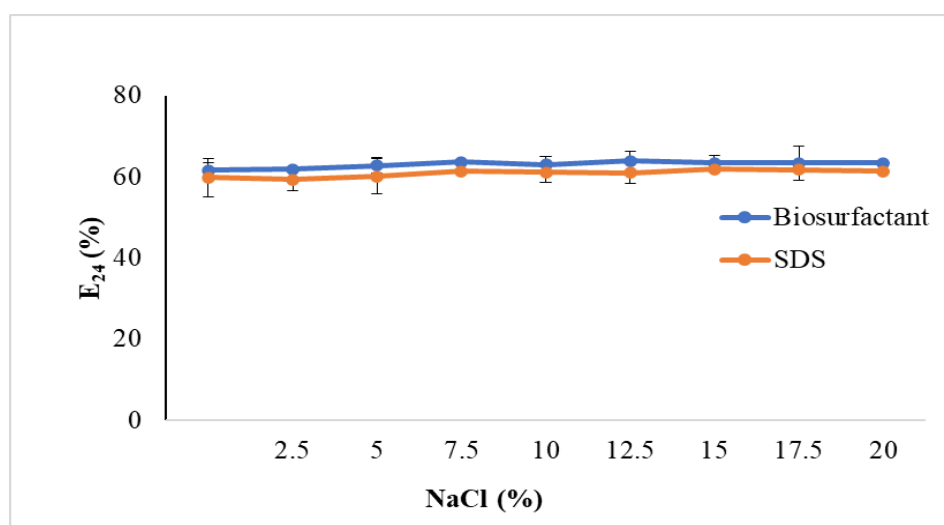
Aparna et al. (2012) ont montré que l'activité émulsifiante optimale (84 %) du biosurfactant produit à partir d'un nouveau *Pseudomonas sp.* Le 2B est observé à pH 7,0. Le SDS a maintenu une émulsion stable à une large gamme de températures et de pH avec de

petites différences d'activité émulsifiante. Les travaux de Ghurye et al. (1994) ont observé un petit changement à pH 12 qui doit être la conséquence de la dénaturation des composés protéiniques du biosurfactant sous pH extrême.

#### IV.3. Effet du NaCl

Le biosurfactant BLA 2906 a montré un profil d'activité d'émulsification presque stable sur différentes concentrations de NaCl (0 à 20 %) (Figure 34).

L'indice d'émulsification pour le biosurfactant BLA 2906 est meilleure par rapport à celui du témoin SDS utilisé à différentes concentrations de chlorure de sodium.



**Figure 34 :** Effet de NaCl sur E<sub>24</sub> de biosurfactant BLA 2906 et SDS.

Les barres verticales représentent l'écart type de trois déterminations.

Les biosurfactants lipopeptidiques ou rhamnolipidiques peuvent tolérés jusqu'à 20 ou 25 % de NaCl (Anyanwu et al., 2011 ; De Sousa et Bhosle, 2012 ; Aparna et al., 2012).

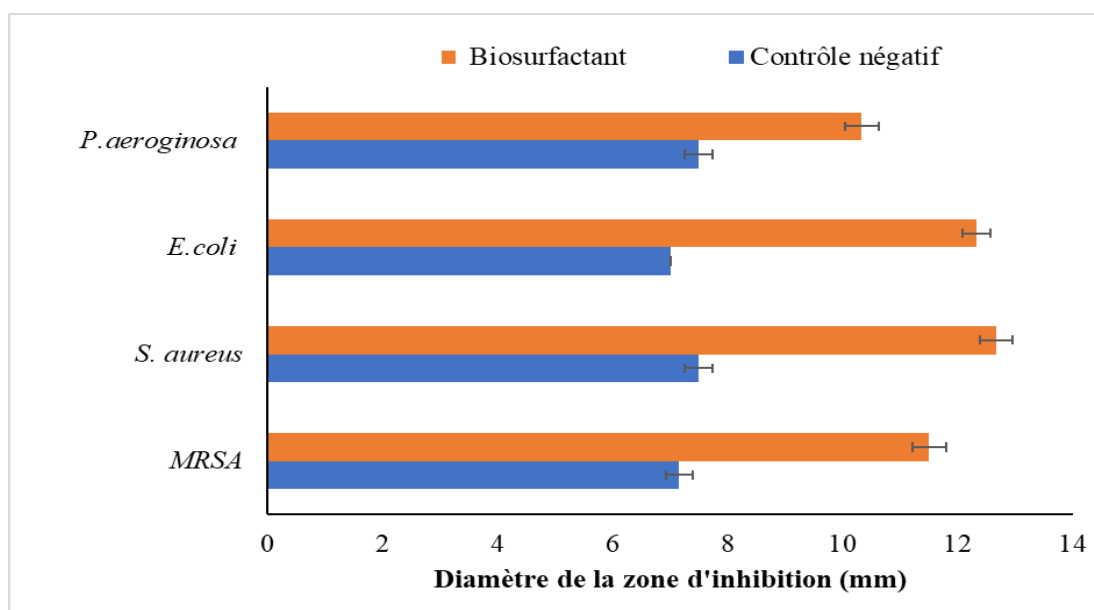
Considérant que 3 % est la salinité de la mer la plus élevée au monde (Silva et al., 2010), les travaux de Thavasi et al. (2007) ont observé qu'il y a une tolérance au sel encore plus élevée (jusqu'à 35 %) pour les biosurfactants obtenus à partir d'un *Pseudomonas aeruginosa* marin. Cela suggère que le biosurfactant pourrait être utile dans les environnements marins et d'autres systèmes où la concentration en sel est supérieure au niveau physiologique (Obayori et al., 2009). Une étude sur la souche *Rhodococcus* sp. TA6 isolée à partir d'un sol contaminé par les hydrocarbures a produit un biosurfactant capable de maintenir sa stabilité en solution avec des concentrations allant jusqu'à 100 g / L de NaCl (Shavandi et al., 2011).

La stabilité des biosurfactants bruts dans une large gamme de conditions de température, de pH et de salinité montre des perspectives claires pour son utilisation dans des conditions environnementales extrêmes telles que la récupération améliorée de l'huile et la biorestauration du sol et de l'environnement. En outre, elle confirme leur potentiel à être utilisé dans de nombreux domaines et en particulier dans une application de bioremédiation.

## V. Activités biologiques

### V.1. Activité antimicrobienne

Les résultats d'activité antibactérienne du biosurfactant BLA 2906 sont montrés sur la figure 35.



**Figure 35 :** Activité antibactérienne du biosurfactant BLA 2906.

Les barres verticales représentent l'écart type de trois déterminations.

Les meilleures activités antibactériennes sont enregistrées contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* avec des zones d'inhibitions de diamètres 12,67 et 12,30 mm respectivement, suivi par *SARM* et *Pseudomonas aeruginosa* avec des diamètres de 11,80 et 10,33 mm, respectivement.

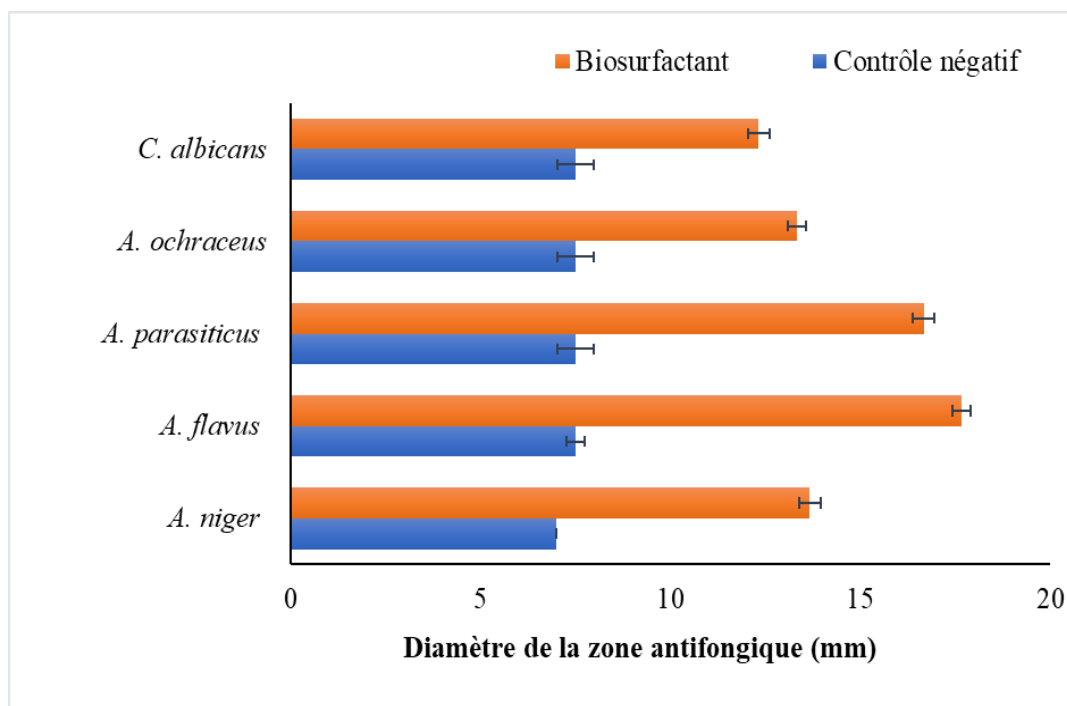
Le biosurfactant lipopeptidique produit par *Bacillus subtilis* C1 a montré une bonne activité antimicrobienne en particulier contre *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium sp.* (Singh et Cameotra, 2004).

Fernandes et al. (2007) ont également observé que les lipopeptides produits par *Bacillus subtilis* R14 sont actifs contre les bactéries multirésistantes, en particulier *Staphylococcus aureus* CI311 et *Enterococcus faecalis* CI 068.

Le biosurfactant lipopeptidique produit par *Bacillus circulans* est efficace contre *Alcaligenes faecalis*, *Proteus vulgaris*, *SARM* et d'autres pathogènes multirésistants (Das et al., 2008a). Le lipide de mannosylérythritol (MEL) produit par *Pseudozyma aphidis* a présenté des effets bactéricides et bactériostatiques sur les spores et les cellules végétatives de *Bacillus cereus* (González-Jaramillo et al., 2017).

Certains biosurfactants microbiens à base de lipopeptides tels que la surfactine, la fengycine, l'iturine, les bacillomycines, les mycosubtilines, etc. synthétisés par *Bacillus subtilis* ont montré un potentiel antimicrobien contre les microbes résistants aux médicaments. Également, des biosurfactants à base de lipopeptides cycliques tels que la daptomycine produite par *Streptomyces roseosporus* et la viscosine de *Pseudomonas sp.*, des rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* des sophorolipides synthétisés par *Candida bombicola* et des lipides de mannosylérythritol de *Candida antarctica* ont présenté une activité antimicrobienne potentielle (Banat et al., 2010).

Les résultats d'activité antifongique du biosurfactant BLA 2906 contre certains champignons sont montrés dans la figure 36.



**Figure 36 :** Activité antifongique du biosurfactant BLA.

Les barres verticales représentent l'écart type de trois déterminations.

Pour *Aspergillus flavus* NRRL 3251 et *Aspergillus parasiticus* CB 5, les halos ont présenté une valeur moyenne de  $17,67 \pm 0,24$  mm et  $16,67 \pm 0,29$  mm, respectivement. Les

autres diamètres d'inhibition obtenus sont : *Aspergillus niger* 939N ;  $13,67 \pm 0,29$  mm, *Aspergillus ochroreus* NRRL 3174 ;  $13,33 \pm 0,24$  mm et *Candida albicans* ATCC 1024 ; de  $12,33 \pm 0,29$  mm. Les biosurfactants lipopeptidiques sont utiles pour prévenir les maladies fongiques chez les plantes.

La surfactine, la fengycine C et l'iturine A isolées de la souche EA-CB0015 de *Bacillus subtilis* ont montré une efficacité contre le champignon *Mycosphaerella fijiensis*.

Les biosurfactants lipopeptidiques pourraient présenter un grand potentiel pour des applications biotechnologiques et biopharmaceutiques en raison de leurs propriétés biologiques. Ils exercent une série d'effets sur les bactéries et les champignons grâce à leur capacité à interagir avec les membranes cellulaires et à perturber diverses fonctions biologiques (González-Jaramillo et al., 2017).

Sur les bactéries, les biosurfactants affectent l'intégrité de la couche plasmique en modifiant les phospholipides et les lipides, ce qui favorise la perméabilité de la membrane et peut conduire à la lyse cellulaire (Soberón-Chávez et al., 2005). Ils inhibent également la croissance bactérienne en perturbant la paroi cellulaire et en modifiant la formation de biofilms (Banat et al., 2014).

Sur les champignons, les biosurfactants agissent de manière similaire en perturbant la membrane plasmique, réduisant la synthèse de la paroi cellulaire fongique composée de chitine et de glucanes, ce qui inhibe la croissance des hyphes (Banat et al., 2010). De plus, ils modifient la formation de biofilms fongiques, influençant ainsi leur adhésion et leur propagation (Ron et Rosenberg, 2014).

Ces mécanismes permettent aux biosurfactants de jouer un rôle important dans des applications de biocontrôle et de bioremédiation, tout en offrant des solutions écologiques face aux infections bactériennes et fongiques (Zhi et al., 2019).

## V.2 Activité anti-inflammatoire

L'effet inhibiteur du biosurfactant BLA 2906 sur la dénaturation des protéines est démontré comme une inhibition de la dénaturation de l'albumine sérique bovine (BSA). Ce biosurfactant, à une concentration de 1mg/mL, a donné un pourcentage d'inhibition de  $94,31 \pm 0,44\%$  tandis qu'à une concentration de 2mg/mL, il a enregistré un taux de  $92,79 \pm 0,07\%$ . Cette valeur n'est pas très différente à celle du contrôle positif qui est de  $92,14 \pm 0,39\%$  à 2mg/mL.

Cette interaction est principalement due aux caractéristiques structurales amphiphiles de ces biomolécules qui vont interagir avec les membranes cellulaires et les macromolécules telles que les enzymes et les lipopolysaccharides (Chang et al., 2011).

La dénaturation des protéines est parmi les causes de l'inflammation, la production d'auto-antigènes dans les maladies inflammatoires peut être due à la dénaturation des protéines *in vivo* (Bagad et al., 2011).

L'inflammation est un processus complexe qui implique plusieurs phénomènes tels que l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la dénaturation des protéines et l'altération de la membrane (Ananthi et al., 2010).

L'inhibition de la dénaturation des protéines est l'une des nombreuses méthodes utilisées en pharmacologie pour les préparations de médicaments (Mizushima et Kobayashi, 1968).

### V.3. Activités antioxydantes

Le tableau XI résume toutes les activités antioxydantes

**Tableau XI :** Activité antioxydante de Biosurfactant BLA 2906

| Test antioxydant (Unité)                             | BLA 2906 | BHA  |
|------------------------------------------------------|----------|------|
| Pouvoir réducteur (mg Eq T/g MS)                     | 0,84     | 0,53 |
| IC <sub>50</sub> Phosphomolybdate (µg/mL)            | 1029     | 12,1 |
| IC <sub>50</sub> DPPH• (µg/mL)                       | 705,48   | 7,61 |
| IC <sub>50</sub> ABTS• <sup>+</sup> (% d'inhibition) | 10,46    | 4,74 |

#### V.3.1. Pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur d'un composé sert d'indicateur significatif de son activité antioxydante. Dans cette étude, la valeur du pouvoir réducteur du biosurfactant BLA 2906 est de 0,84 mg Eq T/g MS (Matière Sèche). Cette valeur est importante par rapport au BHA (0,53 mg Eq T/g MS. Donc, le biosurfactant a le pouvoir de réduire le Fe<sup>3+</sup> en Fe<sup>2+</sup>.

Les biosurfactants sont des tensioactifs qui possèdent des propriétés antioxydantes. Ces composés, grâce à leur structure amphiphile, peuvent interagir avec les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène (ROS), contribuant ainsi à les neutraliser et à prévenir les

dommages oxydatifs. Cette activité antioxydante est particulièrement bénéfique dans des domaines comme les industries alimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Plusieurs études ont montré que des biosurfactants comme les glycolipides, les lipopeptides ou les polymères peuvent exhiber des propriétés antioxydantes, et ce pouvoir est en grande partie dû à leur capacité à interagir avec les radicaux libres, en les neutralisant ou en les empêchant de causer des dommages.

De plus, ces produits naturels sont souvent considérés comme plus sûrs et plus écologiques que les tensioactifs synthétiques, ce qui en fait une alternative attractive pour des formulations respectueuses de l'environnement (Banat et al., 2010 ; Raza et al., 2019).

Les rhamnolipides, produits par *Pseudomonas aeruginosa*, ont démontré une capacité antioxydante notable dans des tests DPPH et FRAP, ce qui les positionne comme des candidats prometteurs pour des applications dans la cosmétique, l'agroalimentaire ou la pharmacologie. En plus de leur efficacité, les glycolipides sont biodégradables, non toxiques et issus de sources renouvelables, ce qui renforce leur intérêt en tant qu'alternatives durables aux antioxydants de synthèse (Santos et al., 2016 ; Twigg et al., 2021).

### V.3.2. Activité au phosphomolybdate

Le résultat de la capacité antioxydante totale du BLA 2906 a donné une valeur de  $1029 \pm 3,66 \mu\text{g} / \text{mL}$  qui provoque une réduction de 50 % de molybdène. L'activité réductrice de BLA 2906 est inférieure à celle de BHA (témoin positif) qui est de  $12,1 \pm 0,4 \mu\text{g} / \text{mL}$ . La capacité antioxydante d'un composé est d'autant plus élevée que son  $\text{IC}_{50}$  est petit (Molyneux, 2004 ; Huang et al., 2005).

Les résultats obtenus sont distincts à ceux trouvés par Yalaoui-Guellal et al. (2020) concernant l'activité réductrice du phosphomolybdène des biosurfactants produits par les souches *Rhodococcus ruber* ( $1363,6 \pm 3,2 \mu\text{g/mL}$ ), *Alcaligenes faecalis* ( $1445,8 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ ) et *Cellulosimicrobium* sp. ( $1661,3 \pm 5,8 \mu\text{g/mL}$ ). Les glycolipides, en tant que biosurfactants naturels produits notamment par des espèces comme *Pseudomonas* ou *Candida*, ont récemment suscité un intérêt croissant pour leurs propriétés antioxydantes (Twigg et al., 2021).

### V.3.3. Activité scavenger au radical DPPH•

Les effets du piégeage du radical DPPH du BLA 2906 et du BHA à des concentrations variables ont montré que la concentration requise pour provoquer une inhibition de 50 % est de  $705,48 \pm 3,89 \mu\text{g} / \text{mL}$  et  $7,61 \pm 0,11 \mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivement. Ce résultat est proche à celui trouvé par Yalaoui-Guellal et al. (2020) concernant le biosurfactant produit par la souche *Alcaligenes faecalis*. Les biosurfactants produits par les souches *Rhodococcus ruber* et *Cellulosimicrobium* sp. ont un  $\text{IC}_{50}$  ( $824 \mu\text{g/mL}$  et  $906 \mu\text{g/mL}$ , respectivement) différent de celui de cette étude (Yalaoui-Guellal et al., 2020). Le BLA 2906 a montré un effet de piégeage de DPPH avec une valeur de 86 % à  $2\text{mg/mL}$ . Cette valeur est plus intéressante en la comparant à celle de Bhosale et al. (2014) qui ont trouvé un effet de piégeage maximal de DPPH du biosurfactant lipopeptidique de *Klebsiella pneumoniae* MSO-32 dans la plage de 76 à 78 % à une concentration de  $10 \text{ mg/mL}$ .

Giri et al. (2019) ont montré une activité de piégeage de DPPH de 73,5 %, avec une concentration de  $5 \text{ mg/mL}$  d'un biosurfactant produit par *Bacillus* sp.

### V.3.4. Activité scavenger au radical ABTS•

Les résultats obtenus diffèrent légèrement de ceux obtenus avec le DPPH. L'activité scavenger du radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  par les solutions étudiées du biosurfactant BLA 2906 et du BHA ont montré un  $\text{IC}_{50}$  de 10,46 % et 4,74 %, respectivement. Ces valeurs sont supérieures en les comparant à celles de Durval et al. (2021) qui ont trouvé un effet de piégeage maximal de l'ABTS ( $4,65 \pm 0,97\%$ ) du bio-tensioactif produit par *Bacillus cereus* RCU à  $1,25 \text{ mg} / \text{mL}$ .

Plusieurs travaux ont mis en évidence l'activité antioxydante de certains biosurfactants, en particulier les lipopeptides produits par *Bacillus subtilis*. L'étude de Ndlovu et al. (2017) a noté que la surfactine, un lipopeptide cyclique, présente une capacité significative à piéger les radicaux libres, évaluée à travers des tests standards tels que DPPH• et  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Ces lipopeptides ont également montré une inhibition notable de la peroxydation lipidique, soulignant leur potentiel en tant qu'agents antioxydants.

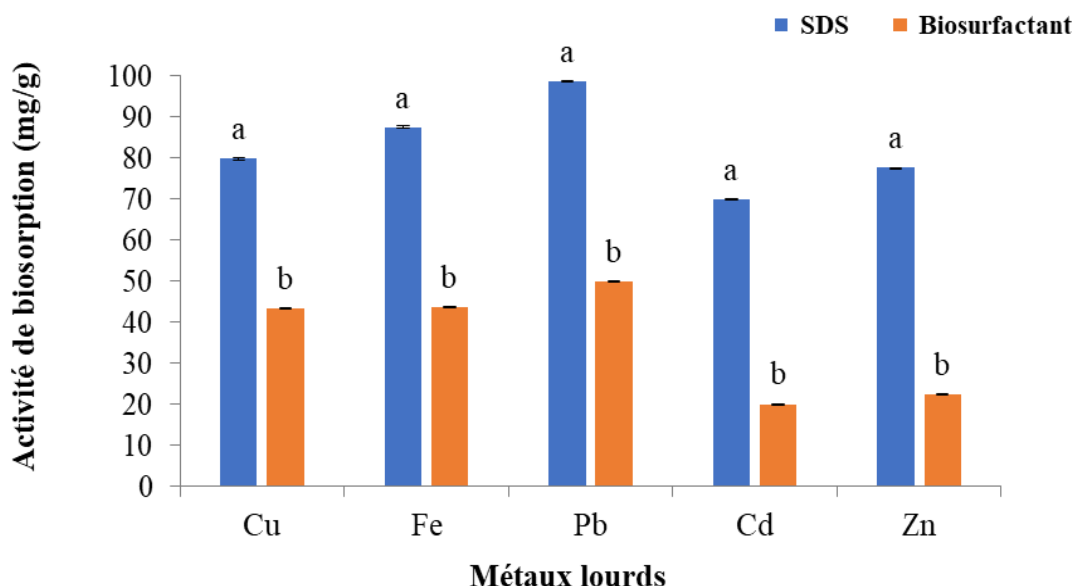
L'activité antioxydante est liée à la structure amphiphile et à la présence de groupes fonctionnels réactifs dans la molécule. Ces résultats ouvrent la voie à l'utilisation des lipopeptides comme alternatives naturelles aux antioxydants synthétiques, notamment dans des applications alimentaires, cosmétiques ou pharmaceutiques (Twigg et al., 2021).

## VI. Activité de biosorption des métaux lourds

Le plomb, cuivre, fer, cadmium et zinc sont des éléments chimiques qui sont naturellement présents dans l'environnement, peuvent devenir toxiques à des concentrations élevées. Ces métaux lourds sont largement utilisés dans diverses industries, mais leur libération dans l'environnement par le biais de processus industriels, agricoles ou de pollution automobile a conduit à de graves problèmes environnementaux et de santé publique (Banat et al., 2010).

Les résultats obtenus (Figure 37) ont montré que la capacité du biosurfactant BLA 2906 à chélater les métaux est variable pour différents métaux en utilisant un pH neutre (pH=7,2). En effet, une meilleure biosorption est enregistrée pour le plomb avec un taux de 98,74 mg/g de SDS et 50 mg/g de BLA 2906, suivi du fer, puis du cuivre avec des valeurs de 87,57 et 79,85 mg/g de SDS et 43,6 et 43,34 mg/g de BLA 2906, respectivement.

Cependant, il y a une faible biosorption des métaux zinc et cadmium, avec des valeurs de 22,48 et 20,08 mg/g de BLA 2906, respectivement, par rapport au SDS. La capacité de biosorption du biosurfactant BLA 2906 et SDS envers les métaux lourds dans la solution aqueuse est donné dans l'ordre suivant : Pb (II) > Fe (II) > Cu (II) > Zn (II) > Cd (II).



**Figure 37 : Activité de biosorption des métaux lourds.**

Différentes lettres indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ). Les résultats sont classés par ordre croissant  $a > b$ .

Une efficacité similaire de cette activité est obtenue dans les travaux de Yalaoui-Guellal et al. (2020) pour les biosurfactants produits par *Rhodococcus ruber*, *Alcaligenes faecalis* et *Cellulosimicrobium sp.* dont les biosurfactants ont un pouvoir de biosorption du plomb à différents pH.

Il a été rapporté que l'activité chélatante des métaux peut dépendre de structures contenant au moins deux des groupes fonctionnels suivants : OH, -COOH, C=O, -NR<sub>2</sub>, -S- et -O- (Qi et al., 2005).

Des travaux ont indiqué l'influence du pH sur la chélation des métaux lourds qui diffère selon le type du milieu traité. Par exemple, l'impact du pH sur l'efficacité de l'élimination des métaux avec l'utilisation des rhamnolipides JBR 515 et JBR 425 est complexe et dépend du type de métal (Kuczajowska-Zadrożna et al., 2015).

Dans leur étude, les deux biosurfactants testés ont montré l'efficacité d'élimination la plus élevée à pH 5–6 et l'augmentation du pH a affecté négativement l'efficacité de l'élimination des métaux (Kuczajowska-Zadrożna et al., 2015).

Le lipopeptide synthétisé par *Candida lipolytica* s'est également avéré efficace pour éliminer 96 % du Cu ainsi que du Zn (Rufino et al., 2012). De plus, les lipopeptides sont également efficaces pour réduire d'autres métaux lourds comme le Cd, le Fe et le Pb. L'efficacité d'élimination du biosurfactant lipopeptidique à différents pH est évaluée et un pH de 9 s'est avéré optimal et efficace pour éliminer certains métaux comme : Cd, Cu, Co, Ni, Pb et Zn (Singh et Cameotra, 2013).

## VII. Criblage des facteurs par Plackett- Burman Design

La conception Plackett-Burman est l'une des conceptions de criblage utilisée pour identifier les facteurs importants pour la croissance de la bactérie étudiée. Quatorze variables analysent leurs effets sur la production de biosurfactants (tableau IV).

Les données répertoriées dans le tableau XII montrent la matrice de conception sélectionnée pour le criblage des variables significatives pour la synthèse de bio-surfactant par la mesure du E<sub>24</sub> et les réponses correspondantes.

**Tableau XII:** Matrice de conception de Plackett-Burman avec la repense d'activité d'émulsification ( $E_{24}$ ) .

| Ordre<br>d'exécution | Valeurs expérimentales |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | Activité<br>d'émulsification<br>( $E_{24}\%$ ) |
|----------------------|------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------------------------------------|
|                      | A                      | B  | C  | D  | E  | F  | G  | H  | I  | J  | K  | L  | M  | N  |                                                |
| 1                    | 1                      | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 1  | 56,70 ± 0,57                                   |
| 2                    | -1                     | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | 57,73 ± 0,21                                   |
| 3                    | -1                     | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | 62,38 ± 0,23                                   |
| 4                    | 1                      | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | 64,34 ± 0,47                                   |
| 5                    | 1                      | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 54,07 ± 0,62                                   |
| 6                    | -1                     | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | 70,58 ± 1,81                                   |
| 7                    | -1                     | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 69,78 ± 1,35                                   |
| 8                    | -1                     | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | 64,34 ± 0,47                                   |
| 9                    | -1                     | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 57,79 ± 0,23                                   |
| 10                   | 1                      | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 1  | 62,88 ± 0,49                                   |
| 11                   | -1                     | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 1  | 62,75 ± 0,64                                   |
| 12                   | 1                      | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | -1 | 52,71 ± 0,44                                   |
| 13                   | -1                     | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | -1 | 56,19 ± 0,12                                   |
| 14                   | 1                      | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 1  | 68,38 ± 0,40                                   |
| 15                   | 1                      | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | -1 | 62,88 ± 0,49                                   |
| 16                   | 1                      | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | -1 | 66,66 ± 1,37                                   |
| 17                   | 1                      | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 68,27 ± 0,67                                   |
| 18                   | -1                     | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 1  | 55,11 ± 0,75                                   |
| 19                   | -1                     | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | -1 | 53,69 ± 0,75                                   |
| 20                   | 1                      | -1 | -1 | 1  | 1  | 1  | 1  | -1 | 1  | -1 | 1  | -1 | -1 | -1 | 51,26 ± 0,27                                   |
| 21                   | 0                      | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 72,92 ± 1,12                                   |

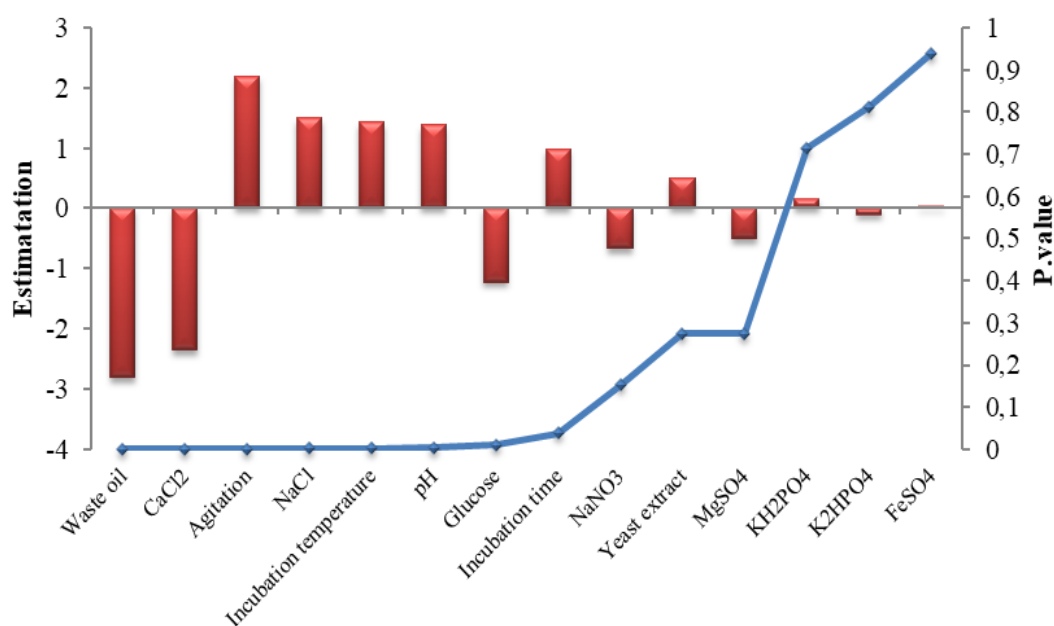
Les résultats ont indiqué une grande variation de l'activité d'émulsification ( $E_{24}$ ) de 50,99 à 74,04 %, dans les 21 essais du plan Plackett-Burman.

Le tableau XIII et la figure 38 représentent l'effet, l'erreur standard, la valeur t, la valeur p et le niveau de confiance de chaque composant à partir du résultat des valeurs d'activité d'émulsification dans le tableau V.

**Tableau XIII:** Production BLA 2906 (E<sub>24</sub>) selon la conception Plackett-Burman.

| Facteurs | Composants moyens               | Effet   | SE       | t, valeur | p, valeur | Niveau de confiance (%) |
|----------|---------------------------------|---------|----------|-----------|-----------|-------------------------|
|          | Constant                        | 61,4944 | 136,4315 | 61,4944   | <,0001    | 99,99 <sup>b</sup>      |
| A        | K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | -0,1103 | 0,4618   | -0,24     | 0,8118    | 18,82 <sup>a</sup>      |
| B        | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,1703  | 0,4618   | 0,37      | 0,7133    | 28,67 <sup>a</sup>      |
| C        | NaCl                            | 1,5013  | 0,4618   | 3,25      | 0,0018    | 99,82 <sup>b</sup>      |
| D        | NaNO <sub>3</sub>               | -0,6678 | 0,4618   | -1,45     | 0,1527    | 84,73 <sup>a</sup>      |
| E        | CaCl <sub>2</sub>               | -2,3516 | 0,4618   | -5,09     | <,0001    | 99,99 <sup>c</sup>      |
| F        | MgSO <sub>4</sub>               | -0,5093 | 0,4618   | -1,10     | 0,2739    | 72,61 <sup>a</sup>      |
| G        | FeSO <sub>4</sub>               | 0,0353  | 0,4618   | 0,08      | 0,9392    | 06,08 <sup>a</sup>      |
| H        | Glucose                         | -1,2258 | 0,4618   | -2,65     | 0,0099    | 99,01 <sup>c</sup>      |
| I        | Huile usée                      | -2,8128 | 0,4618   | -6,09     | <,0001    | 99,99 <sup>c</sup>      |
| J        | Extrait de levure               | 0,5098  | 0,4618   | 1,10      | 0,2735    | 72,65 <sup>a</sup>      |
| K        | pH                              | 1,3871  | 0,4618   | 3,00      | 0,0037    | 99,63 <sup>b</sup>      |
| L        | Température d'incubation        | 1,4273  | 0,4618   | 3,09      | 0,0029    | 99,71 <sup>b</sup>      |
| M        | Temps d'incubation              | 0,9813  | 0,4618   | 2,12      | 0,0372    | 96,28 <sup>b</sup>      |
| N        | Agitation                       | 2,1898  | 0,4618   | 4,74      | <,0001    | 99,99 <sup>b</sup>      |

SE : erreur standard ; R-Sq.max = 0,9872 ; a Non significatif à  $P < 0,05$  ; b Effet positif significatif à  $P < 0,05$  ; c Effet négatif significatif à  $P < 0,05$ .

**Figure 38 :** Conditions de production de BLA 2906.

L'équation du modèle pour la production de biosurfactant (Y) pourrait être écrite comme suivant :

$$Y_{\text{activité d'émulsification}} = 61,4944 - 2,8128*I - 2,3516*E + 2,1898*N + 1,5013*C + 1,4273*L + 1,3871*K - 1,2258*H + 0,9813*M - 0,6678*D + 0,5098*J - 0,5093*F + 0,1703*B - 0,1103*A + 0,0353*G$$

Où **A** : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, **B** : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, **C** : NaCl, **D** : NaNO<sub>3</sub>, **E** : CaCl<sub>2</sub>, **F** : MgSO<sub>4</sub>, **G** : FeSO<sub>4</sub>, **H** : glucose, **I** : huile usée, **J** : extrait de levure, **K** : pH, **L** : température d'incubation, **M** : temps d'incubation et **N** : agitation.

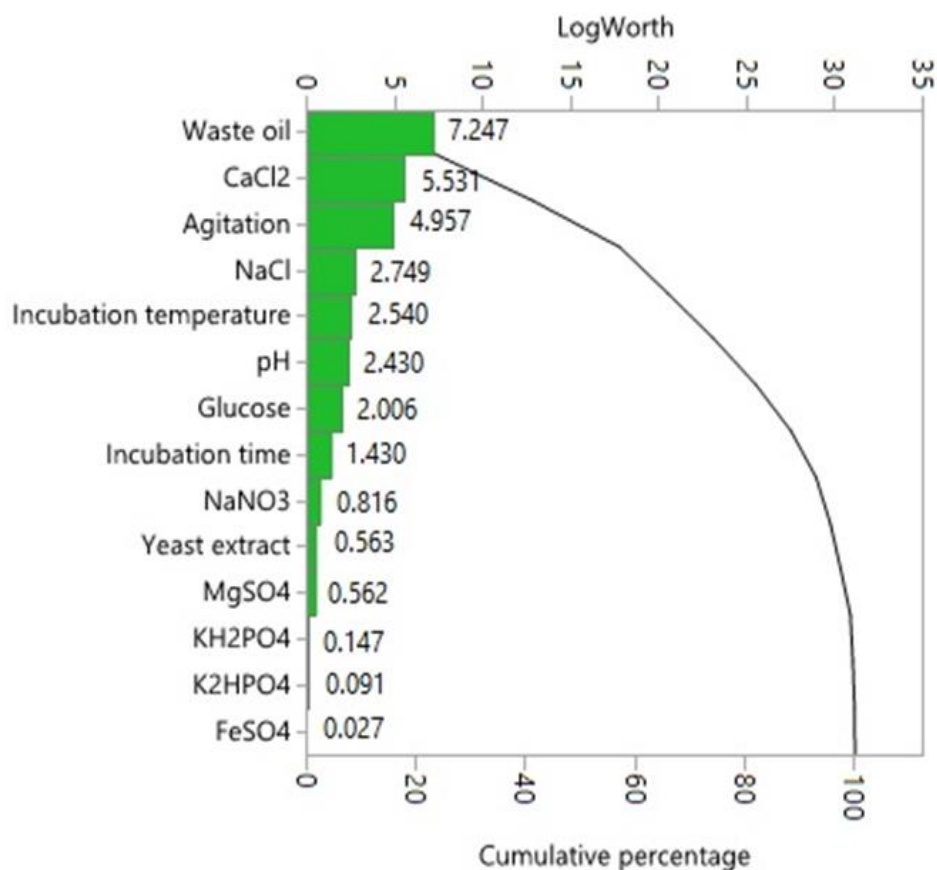
L'analyse statistique des coefficients de régression et des valeurs t de 14 facteurs (Tableau XIII) a montré que C, K, L, M et N ont des effets positifs sur la production de biosurfactants. Elle a indiqué que ces composants ont une concentration plus élevée que les concentrations de valeur élevée (+) indiquées dans le plan d'expérience.

Les constituants du milieu de culture : H et I ont eu des effets négatifs, elle a indiqué que ces composants sont efficaces dans la production de biosurfactants mais que la quantité requise est inférieure à la faible concentration (-) indiquée dans l'expérience Plackett-Burman.

Ces résultats sont confirmés à partir du graphique de Pareto comme le montre la figure 39, qui a indiqué que des effets plus élevés (+) sont présentés dans la partie supérieure et les effets les plus faibles (-) sont dans la partie l'inférieur.

Cette transformation ajuste les valeurs p pour fournir une échelle appropriée pour la représentation graphique. Une valeur supérieure à 2 est significative au niveau 0,01 (car -log<sub>10</sub> (0,01) = 2).

La variable avec un niveau de confiance supérieur à 99 % est considérée comme un paramètre significatif. Il est clair que les variables C, E, H, I, K, L et N sont les facteurs significatifs sélectionnés pour l'étude de la méthodologie de surface de réponse tandis que les variables A, B, D, F, J et M, avec des niveaux de confiance inférieurs à 99%, ne sont pas inclus dans l'expérience de méthodologie de surface de réponse.



**Figure 39 :** Diagramme de Pareto des facteurs affectant la production de BLA 2906.

Le résultat est en accord avec le rapport de [Singh et al. \(2013\)](#) qui ont signalé l'effet des besoins en nutriments et des conditions de culture sur la production de rhamnolipides à partir de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* (MTCC 7815) par l'utilisation de l'huile de graines de *Mesua ferrea* ([Singh et al., 2013](#)). Des résultats similaires sont obtenus par d'autres études où les conditions de culture ont affecté la synthèse de biosurfactant ([Kalyani et al., 2014](#) ; [Korayem et al., 2015](#)).

### VIII. Optimisation des composants du milieu par la méthodologie de surface de réponse

Sept variables (NaCl, CaCl<sub>2</sub>, glucose, huiles usées, pH, température d'incubation et agitation) sont sélectionnées par la conception Plackett-Burman pour la production de biosurfactant à l'aide d'une conception composite centrale (CCD) (Tableau XIV). Les variables ci-dessus influencent fortement la production de biosurfactants. La méthodologie de réponse est utilisée comme conception statistique pour modéliser la production de biosurfactants en termes d'activité d'émulsification.

**Tableau XIV:** Exécutions des variables du plan composite central (CCD) avec la repense E<sub>24</sub>

| Ordre | Configuration | Variables Expérimentales |                |                |                |                |                |                | Activité d'émulsification (E <sub>24</sub> %) |                |
|-------|---------------|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------------------------------|----------------|
|       |               | X <sub>1</sub>           | X <sub>2</sub> | X <sub>3</sub> | X <sub>4</sub> | X <sub>5</sub> | X <sub>6</sub> | X <sub>7</sub> | Valeur observée                               | Valeur prédite |
| 1     | -----         | 2                        | 0,02           | 5              | 5              | 6              | 30             | 100            | 64,71±0,18                                    | 64,56          |
| 2     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 5              | 6              | 36             | 200            | 63,59± 0,50                                   | 63,47          |
| 3     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 5              | 8              | 30             | 200            | 63,53± 1,09                                   | 63,77          |
| 4     | -----++-      | 2                        | 0,02           | 5              | 5              | 8              | 36             | 100            | 62,81± 0,34                                   | 62,87          |
| 5     | -----++       | 2                        | 0,02           | 5              | 15             | 6              | 30             | 200            | 64,93± 0,72                                   | 64,76          |
| 6     | -----++-      | 2                        | 0,02           | 5              | 15             | 6              | 36             | 100            | 63,77± 0,48                                   | 63,91          |
| 7     | -----++-      | 2                        | 0,02           | 5              | 15             | 8              | 30             | 100            | 66,69± 0,47                                   | 66,34          |
| 8     | -----++++     | 2                        | 0,02           | 5              | 15             | 8              | 36             | 200            | 62,87± 0,44                                   | 63,00          |
| 9     | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 5              | 6              | 30             | 200            | 64,27± 1,30                                   | 63,83          |
| 10    | -----++-      | 2                        | 0,02           | 15             | 5              | 6              | 36             | 100            | 64,21± 0,35                                   | 64,31          |
| 11    | -----++-      | 2                        | 0,02           | 15             | 5              | 8              | 30             | 100            | 66,72± 1,26                                   | 66,51          |
| 12    | -----++++     | 2                        | 0,02           | 15             | 5              | 8              | 36             | 200            | 61,45± 0,11                                   | 61,69          |
| 13    | -----++       | 2                        | 0,02           | 15             | 15             | 6              | 30             | 100            | 65,44± 0,93                                   | 65,54          |
| 14    | -----++++     | 2                        | 0,02           | 15             | 15             | 6              | 36             | 200            | 62,26± 0,80                                   | 62,78          |
| 15    | -----++++     | 2                        | 0,02           | 15             | 15             | 8              | 30             | 200            | 64,12± 0,67                                   | 64,12          |
| 16    | -----++++-    | 2                        | 0,02           | 15             | 15             | 8              | 36             | 100            | 64,04± 1,92                                   | 63,81          |
| 17    | -----++       | 2                        | 0,1            | 5              | 5              | 6              | 30             | 200            | 62,26± 0,80                                   | 62,46          |
| 18    | -----++-      | 2                        | 0,1            | 5              | 5              | 6              | 36             | 100            | 61,54± 0,05                                   | 61,64          |
| 19    | -----++-      | 2                        | 0,1            | 5              | 5              | 8              | 30             | 100            | 63,66± 1,18                                   | 63,70          |
| 20    | -----++++     | 2                        | 0,1            | 5              | 5              | 8              | 36             | 200            | 61,87± 0,66                                   | 61,51          |
| 21    | -----++       | 2                        | 0,1            | 5              | 15             | 6              | 30             | 100            | 63,87± 0,80                                   | 63,85          |
| 22    | -----++++     | 2                        | 0,1            | 5              | 15             | 6              | 36             | 200            | 63,95± 0,60                                   | 63,73          |
| 23    | -----++++     | 2                        | 0,1            | 5              | 15             | 8              | 30             | 200            | 65,03± 0,53                                   | 64,93          |
| 24    | -----++++-    | 2                        | 0,1            | 5              | 15             | 8              | 36             | 100            | 62,88± 0,24                                   | 63,32          |
| 25    | -----++       | 2                        | 0,1            | 15             | 5              | 6              | 30             | 100            | 62,88± 0,44                                   | 63,00          |
| 26    | -----++++     | 2                        | 0,1            | 15             | 5              | 6              | 36             | 200            | 61,26± 0,80                                   | 61,40          |
| 27    | -----++++     | 2                        | 0,1            | 15             | 5              | 8              | 30             | 200            | 62,32± 0,86                                   | 62,36          |
| 28    | -----++++-    | 2                        | 0,1            | 15             | 5              | 8              | 36             | 100            | 62,01± 0,65                                   | 62,08          |
| 29    | -----++++     | 2                        | 0,1            | 15             | 15             | 6              | 30             | 200            | 62,24± 0,78                                   | 62,56          |
| 30    | -----++++-    | 2                        | 0,1            | 15             | 15             | 6              | 36             | 100            | 62,98± 1,15                                   | 62,33          |
| 31    | -----++++-    | 2                        | 0,1            | 15             | 15             | 8              | 30             | 100            | 65,19± 1,14                                   | 65,43          |
| 32    | -----+++++    | 2                        | 0,1            | 15             | 15             | 8              | 36             | 200            | 61,98± 0,62                                   | 61,58          |
| 33    | -----++       | 4                        | 0,02           | 5              | 5              | 6              | 30             | 200            | 62,13± 0,69                                   | 62,20          |
| 34    | -----++-      | 4                        | 0,02           | 5              | 5              | 6              | 36             | 100            | 61,96± 0,72                                   | 61,75          |
| 35    | -----++-      | 4                        | 0,02           | 5              | 5              | 8              | 30             | 100            | 63,48± 0,66                                   | 63,93          |
| 36    | -----++++     | 4                        | 0,02           | 5              | 5              | 8              | 36             | 200            | 61,56± 0,05                                   | 61,45          |
| 37    | -----++       | 4                        | 0,02           | 5              | 15             | 6              | 30             | 100            | 62,73± 0,20                                   | 62,60          |
| 38    | -----++++     | 4                        | 0,02           | 5              | 15             | 6              | 36             | 200            | 62,23± 0,76                                   | 62,17          |
| 39    | -----++++     | 4                        | 0,02           | 5              | 15             | 8              | 30             | 200            | 63,34± 0,74                                   | 63,50          |

Suite du tableau XIV

|    |         |   |      |    |    |   |    |     |             |       |
|----|---------|---|------|----|----|---|----|-----|-------------|-------|
| 40 | +-----+ | 4 | 0,02 | 5  | 15 | 8 | 36 | 100 | 62,27± 0,82 | 62,25 |
| 41 | +-----  | 4 | 0,02 | 15 | 5  | 6 | 30 | 100 | 64,08± 0,60 | 64,45 |
| 42 | +-----+ | 4 | 0,02 | 15 | 5  | 6 | 36 | 200 | 62,82± 0,83 | 62,55 |
| 43 | +-----+ | 4 | 0,02 | 15 | 5  | 8 | 30 | 200 | 63,53± 0,66 | 63,64 |
| 44 | +-----+ | 4 | 0,02 | 15 | 5  | 8 | 36 | 100 | 63,74± 0,82 | 63,72 |
| 45 | +-----+ | 4 | 0,02 | 15 | 15 | 6 | 30 | 200 | 62,26± 0,80 | 62,35 |
| 46 | +-----+ | 4 | 0,02 | 15 | 15 | 6 | 36 | 100 | 62,30± 0,79 | 62,49 |
| 47 | +-----  | 4 | 0,02 | 15 | 15 | 8 | 30 | 100 | 65,93± 0,44 | 65,71 |
| 48 | +-----+ | 4 | 0,02 | 15 | 15 | 8 | 36 | 200 | 61,87± 0,66 | 61,55 |
| 49 | +-----  | 4 | 0,1  | 5  | 5  | 6 | 30 | 100 | 60,92± 1,01 | 60,95 |
| 50 | +-----+ | 4 | 0,1  | 5  | 5  | 6 | 36 | 200 | 61,13± 0,70 | 61,68 |
| 51 | +-----+ | 4 | 0,1  | 5  | 5  | 8 | 30 | 200 | 62,86± 0,22 | 62,63 |
| 52 | +-----+ | 4 | 0,1  | 5  | 5  | 8 | 36 | 100 | 61,87± 0,66 | 61,42 |
| 53 | +-----+ | 4 | 0,1  | 5  | 15 | 6 | 30 | 200 | 62,50± 0,53 | 62,47 |
| 54 | +-----+ | 4 | 0,1  | 5  | 15 | 6 | 36 | 100 | 61,26± 0,80 | 61,30 |
| 55 | +-----  | 4 | 0,1  | 5  | 15 | 8 | 30 | 100 | 64,48± 0,44 | 64,39 |
| 56 | +-----+ | 4 | 0,1  | 5  | 15 | 8 | 36 | 200 | 62,76± 0,26 | 62,87 |
| 57 | +-----+ | 4 | 0,1  | 15 | 5  | 6 | 30 | 200 | 61,87± 0,66 | 61,59 |
| 58 | +-----+ | 4 | 0,1  | 15 | 5  | 6 | 36 | 100 | 61,74± 0,44 | 61,75 |
| 59 | +-----  | 4 | 0,1  | 15 | 5  | 8 | 30 | 100 | 64,83± 0,31 | 64,59 |
| 60 | +-----+ | 4 | 0,1  | 15 | 5  | 8 | 36 | 200 | 61,13± 0,70 | 61,60 |
| 61 | +-----  | 4 | 0,1  | 15 | 15 | 6 | 30 | 100 | 62,54± 0,42 | 62,48 |
| 62 | +-----+ | 4 | 0,1  | 15 | 15 | 6 | 36 | 200 | 61,67± 0,28 | 61,54 |
| 63 | +-----+ | 4 | 0,1  | 15 | 15 | 8 | 30 | 200 | 63,46± 0,59 | 63,53 |
| 64 | +-----+ | 4 | 0,1  | 15 | 15 | 8 | 36 | 100 | 62,51± 0,38 | 62,90 |
| 65 | a000000 | 2 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 | 63,16± 1,09 | 63,37 |
| 66 | A000000 | 4 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 | 62,76± 0,40 | 62,52 |
| 67 | 0a00000 | 3 | 0,02 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 | 64,39± 0,34 | 64,47 |
| 68 | 0A00000 | 3 | 0,1  | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 | 63,70± 0,65 | 63,59 |
| 69 | 00a0000 | 3 | 0,06 | 5  | 10 | 7 | 33 | 150 | 62,37± 0,81 | 62,46 |
| 70 | 00A0000 | 3 | 0,06 | 15 | 10 | 7 | 33 | 150 | 62,72± 0,75 | 62,60 |
| 71 | 000a000 | 3 | 0,06 | 10 | 5  | 7 | 33 | 150 | 61,16± 1,38 | 60,87 |
| 72 | 000A000 | 3 | 0,06 | 10 | 15 | 7 | 33 | 150 | 61,14± 1,32 | 61,40 |
| 73 | 0000a00 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 6 | 33 | 150 | 62,27± 1,40 | 62,15 |
| 74 | 0000A00 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 8 | 33 | 150 | 62,63± 1,34 | 62,72 |
| 75 | 00000a0 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 30 | 150 | 62,23± 0,76 | 62,33 |
| 76 | 00000A0 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 36 | 150 | 61,13± 0,70 | 61,00 |
| 77 | 000000a | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 100 | 62,63± 1,34 | 62,80 |
| 78 | 000000A | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 200 | 62,23± 0,76 | 62,03 |
| 79 | 0000000 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 | 62,26± 0,27 | 62,35 |
| 80 | 0000000 | 3 | 0,06 | 10 | 10 | 7 | 33 | 150 | 63,16± 1,40 | 62,35 |

La matrice de conception et les résultats correspondants des expériences RSM visant à déterminer les effets de sept variables indépendantes sont présentés dans le tableau VII, ainsi que les valeurs prédites. La concentration de biosurfactant la plus élevée en termes d'activité d'émulsification de  $66,72 \pm 1,26$  % est acquise dans les conditions définies à  $(X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7) = (-1, -1, +1, -1, +1, -1, -1)$  (essai 11) correspondant à 2 g/L de NaCl, 0,02 g/L de  $\text{CaCl}_2$ , 15 g/L de glucose, 5 g/L d'huile usagée, pH 8, température 30 °C et agitation à 100 tr/min et une valeur prédite correspondante de 66,51 %.

### VIII.1. Équation de régression RSM et analyse du modèle

Après analyse de régression, une équation quadratique est obtenue à l'aide de JMP 15.2.1., comme indiqué dans l'équation suivante :

$$\begin{aligned} E_{24} (\%) = & 62,35 - 0,42 X_1 - 0,44 X_2 + 0,07 X_3 + 0,27 X_4 + 0,29 X_5 - 0,66 X_6 - 0,38 X_7 + \\ & 0,17 X_1X_2 + 0,21 X_1X_3 - 0,14 X_2X_3 - 0,14 X_1X_4 + 0,20 X_2X_4 - 0,21 X_3X_4 + 0,20 \\ & X_1X_5 + 0,16 X_2X_5 + 0,02 X_3X_5 + 0,10 X_4X_5 + 0,10 X_1X_6 + 0,09 X_2X_6 - 0,08 X_3X_6 \\ & - 0,06 X_4X_6 - 0,32 X_5X_6 + 0,09 X_1X_7 + 0,18 X_2X_7 - 0,32 X_3X_7 + 0,03 X_4X_7 - 0,22 \\ & X_5X_7 + 0,16 X_6X_7 + 0,58 X_1^2 + 1,67 X_2^2 + 0,17 X_3^2 - 1,23 X_4^2 + 0,07 X_5^2 - 0,70 X_6^2 \\ & + 0,05 X_7^2 \end{aligned}$$

Où  $X_1$  est NaCl,  $X_2$  est  $\text{CaCl}_2$ ,  $X_3$  est le glucose,  $X_4$  est l'huile usée,  $X_5$  est le pH,  $X_6$  est la température d'incubation et  $X_7$  est l'agitation. Les termes interactifs  $X_1 \cdot X_3$ ,  $X_2 \cdot X_4$ ,  $X_3 \cdot X_4$ ,  $X_1 \cdot X_5$ ,  $X_5 \cdot X_6$ ,  $X_3 \cdot X_7$  et  $X_5 \cdot X_7$  ont eu une grande influence sur la production de biosurfactants pendant la fermentation.

Le tableau XV représente les résultats des analyses de variance (ANOVA) pour le modèle de régression des biosurfactants. La « valeur F » du modèle est de 31,8578 et la valeur de « Prob > F » < 0,0001, ce qui suggère que le modèle est hautement significatif.

**Tableau XV:** Analyse de variance du modèle quadratique de surface de réponse.

| Source                              | DF | SS        | SE       | t-valeur | F-valeur | P-valeur Prob, > F   |
|-------------------------------------|----|-----------|----------|----------|----------|----------------------|
| <b>Modele</b>                       | 35 | 126,53821 | 0,0964   |          | 31,8578  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| <b>Linéaire</b>                     | 7  |           |          |          |          |                      |
| X <sub>1</sub>                      | 1  | 11,853347 | 0,041466 | -10,22   | 104,4488 | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>2</sub>                      | 1  | 12,637188 | 0,041466 | -10,55   | 111,3559 | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>3</sub>                      | 1  | 0,315055  | 0,041466 | 1,67     | 2,7762   | 0,1028 <sup>d</sup>  |
| X <sub>4</sub>                      | 1  | 4,688002  | 0,041466 | 6,43     | 41,3095  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>5</sub>                      | 1  | 5,383674  | 0,041466 | 6,89     | 47,4396  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>6</sub>                      | 1  | 28,815638 | 0,041466 | -15,93   | 253,9165 | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>7</sub>                      | 1  | 9,767456  | 0,041466 | -9,28    | 104,4488 | <0,0001 <sup>a</sup> |
| <b>Carré</b>                        | 7  |           |          |          |          |                      |
| X <sub>1</sub> *X <sub>1</sub>      | 1  | 0,789792  | 0,22107  | 2,64     | 6,9595   | 0,0115 <sup>c</sup>  |
| X <sub>2</sub> *X <sub>2</sub>      | 1  | 6,462119  | 0,22107  | 7,55     | 56,9426  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>3</sub> *X <sub>3</sub>      | 1  | 0,065694  | 0,22107  | 0,76     | 0,5789   | 0,4508 <sup>d</sup>  |
| X <sub>4</sub> *X <sub>4</sub>      | 1  | 3,494842  | 0,22107  | -5,55    | 30,7957  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>5</sub> *X <sub>5</sub>      | 1  | 0,012442  | 0,22107  | 0,33     | 0,1096   | 0,7421 <sup>d</sup>  |
| X <sub>6</sub> *X <sub>6</sub>      | 1  | 1,127449  | 0,22107  | -3,15    | 9,9348   | 0,0029 <sup>b</sup>  |
| X <sub>7</sub> *X <sub>7</sub>      | 1  | 0,006572  | 0,22107  | 0,24     | 0,0579   | 0,8109 <sup>d</sup>  |
| <b>Interaction bidirectionnelle</b> | 21 |           |          |          |          |                      |
| X <sub>1</sub> *X <sub>2</sub>      | 1  | 1,819127  | 0,042109 | 4,00     | 16,0297  | 0,0002 <sup>b</sup>  |
| X <sub>1</sub> *X <sub>3</sub>      | 1  | 2,801439  | 0,042109 | 4,97     | 24,6856  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>2</sub> *X <sub>3</sub>      | 1  | 1,174514  | 0,042109 | -3,22    | 10,3495  | 0,0025 <sup>b</sup>  |
| X <sub>1</sub> *X <sub>4</sub>      | 1  | 1,179939  | 0,042109 | -3,22    | 10,3973  | 0,0024 <sup>b</sup>  |
| X <sub>2</sub> *X <sub>4</sub>      | 1  | 2,516189  | 0,042109 | 4,71     | 22,1721  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>3</sub> *X <sub>4</sub>      | 1  | 2,954102  | 0,042109 | -5,10    | 26,0308  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>1</sub> *X <sub>5</sub>      | 1  | 2,429702  | 0,042109 | 4,63     | 21,4099  | <0,0001 <sup>a</sup> |
| X <sub>2</sub> *X <sub>5</sub>      | 1  | 1,553139  | 0,042109 | 3,70     | 13,6859  | 0,0006 <sup>b</sup>  |
| X <sub>3</sub> *X <sub>5</sub>      | 1  | 0,036577  | 0,042109 | 0,57     | 0,3223   | 0,5731 <sup>d</sup>  |
| X <sub>4</sub> *X <sub>5</sub>      | 1  | 0,658127  | 0,042109 | 2,41     | 5,7993   | 0,0203 <sup>c</sup>  |

Suite du tableau XV

|                          |    |           |          |       |               |                      |
|--------------------------|----|-----------|----------|-------|---------------|----------------------|
| $X_1 * X_6$              | 1  | 0,614264  | 0,042109 | 2,33  | 5,4127        | 0,0247 <sup>c</sup>  |
| $X_2 * X_6$              | 1  | 0,520202  | 0,042109 | 2,14  | 4,5839        | 0,0379 <sup>c</sup>  |
| $X_3 * X_6$              | 1  | 0,376689  | 0,042109 | -1,82 | 3,3193        | 0,0772 <sup>d</sup>  |
| $X_4 * X_6$              | 1  | 0,224439  | 0,042109 | -1,41 | 1,9777        | 0,1667 <sup>d</sup>  |
| $X_5 * X_6$              | 1  | 6,624189  | 0,042109 | -7,64 | 58,3708       | <0,0001 <sup>a</sup> |
| $X_1 * X_7$              | 1  | 0,553164  | 0,042109 | 2,21  | 4,8743        | 0,0325 <sup>c</sup>  |
| $X_2 * X_7$              | 1  | 1,977539  | 0,042109 | 4,17  | 17,4256       | 0,0001 <sup>b</sup>  |
| $X_3 * X_7$              | 1  | 6,419889  | 0,042109 | -7,52 | 56,5705       | <0,0001 <sup>a</sup> |
| $X_4 * X_7$              | 1  | 0,073577  | 0,042109 | 0,81  | 0,6483        | 0,4250 <sup>d</sup>  |
| $X_5 * X_7$              | 1  | 3,005889  | 0,042109 | -5,15 | 26,4872       | <0,0001 <sup>a</sup> |
| $X_6 * X_7$              | 1  | 1,565627  | 0,042109 | 3,71  | 13,7959       | 0,0006 <sup>b</sup>  |
| <b>Inadéquation</b>      | 43 | 4,588327  |          |       | <b>0,2635</b> | 0,9421 <sup>d</sup>  |
| <b>Erreur totale</b>     | 44 | 4,993327  |          |       |               |                      |
| <b>Erreur pure</b>       | 1  | 0,405000  |          |       |               |                      |
| <b>Correction totale</b> | 79 | 131,53154 |          |       |               |                      |

SE : erreur type ; DF : degré de liberté ; SS : somme des carrés. R-Sq.max = 0,9969 ; R-Sq.= 0,9620 ; Adj.-R-Sq.= 0,9318. a : Coefficient significatif avec un niveau de confiance de 99,99 %. b: Coefficients significatifs avec un niveau de confiance de 99 %. c : Coefficients significatifs supérieurs à 95 % de confiance. d: Non significatif avec un niveau de confiance de 95 %.

Termes linéaires de  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_5$ ,  $X_6$ ,  $X_7$ , termes quadratiques de  $X_2$ ,  $X_4$  et termes interactifs de  $X_1 * X_3$ ,  $X_2 * X_4$ ,  $X_3 * X_4$ ,  $X_1 * X_5$ ,  $X_5 * X_6$ ,  $X_3 * X_7$ , et  $X_5 * X_7$  sont très significatifs pour la production du biosurfactant BLA 2906 avec une valeur  $P < 0,0001$ . Termes quadratiques de  $X_1$ ,  $X_4$  et termes interactifs de  $X_1 * X_2$ ,  $X_2 * X_3$ ,  $X_1 * X_4$ ,  $X_2 * X_5$ ,  $X_4 * X_5$ ,  $X_1 * X_6$ ,  $X_2 * X_6$ ,  $X_1 * X_7$ ,  $X_2 * X_7$ ,  $X_6 * X_7$  sont également significatifs pour la production du biosurfactant BLA2906 ( $0,0001 < \text{valeur } P < 0,05$ ). Cependant, les autres termes ( $X_3$ ,  $X_3 * X_3$ ,  $X_5 * X_5$ ,  $X_7 * X_7$ ,  $X_3 * X_5$ ,  $X_3 * X_6$ ,  $X_4 * X_6$ ,  $X_4 * X_7$ ) sont insignifiants (valeur  $P > 0,05$ ).

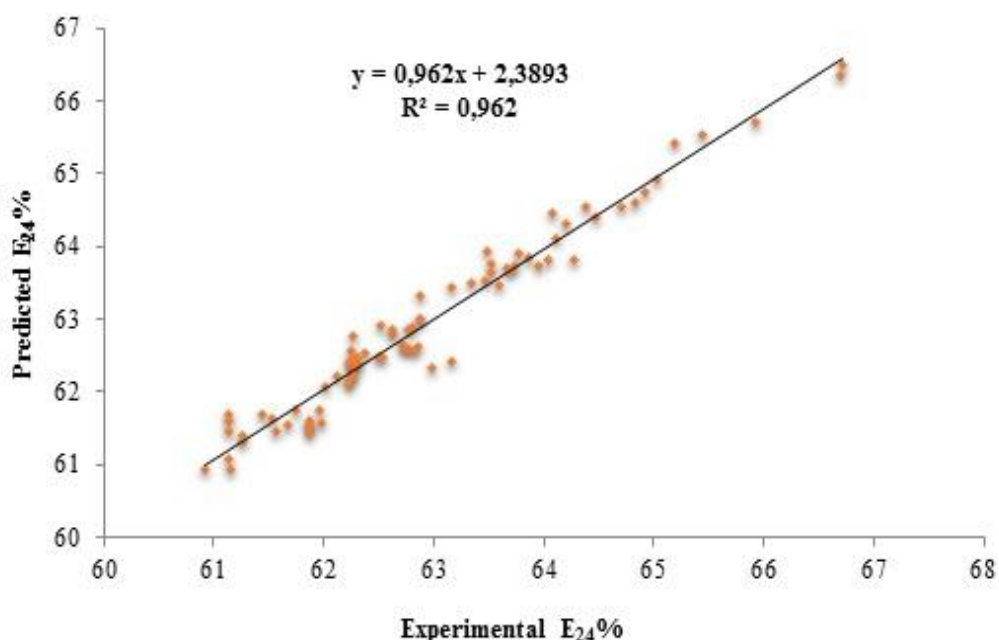
Le coefficient de détermination ( $R^2$ ) est calculé à 0,9969 pour la production du biosurfactant BLA 2906, indiquant un bon accord entre les valeurs expérimentales et prédites. Le  $R^2$  prédite (0,9620) est en accord raisonnable avec  $R^2$  ajusté (0,9318). Il est démontré que le modèle a une valeur  $R^2$  ajustée de 93,18 %.

Ce qui suggère que seulement 6,92 % de la variabilité des réponses des biosurfactants ne peut pas être expliquée par celui-ci et que les variations observées sont dues aux effets des facteurs et non au bruit.

Pour confirmer l'adéquation du modèle de biosurfactant à expliquer les variations des données, un examen du résultat du test de manque d'ajustement dans le tableau ANOVA est effectué. La valeur F pour le manque d'ajustement est de 0,2635 (tableau XV) et sa valeur P est de 0,9421 (non significative), démontrant que le modèle est bon et qu'ils montrent l'adéquation du modèle pour expliquer les données dans la région expérimentale. Le modèle s'est avéré adéquat pour la prévision dans la gamme de variables utilisées.

Une équation polynomiale du second ordre est utilisé pour déterminer l'influence de paramètres d'entrés individuels sur la production de biosurfactant BLA 2906 (en termes d'activité d'émulsification) par *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 au moyen d'une analyse de régression multiple.

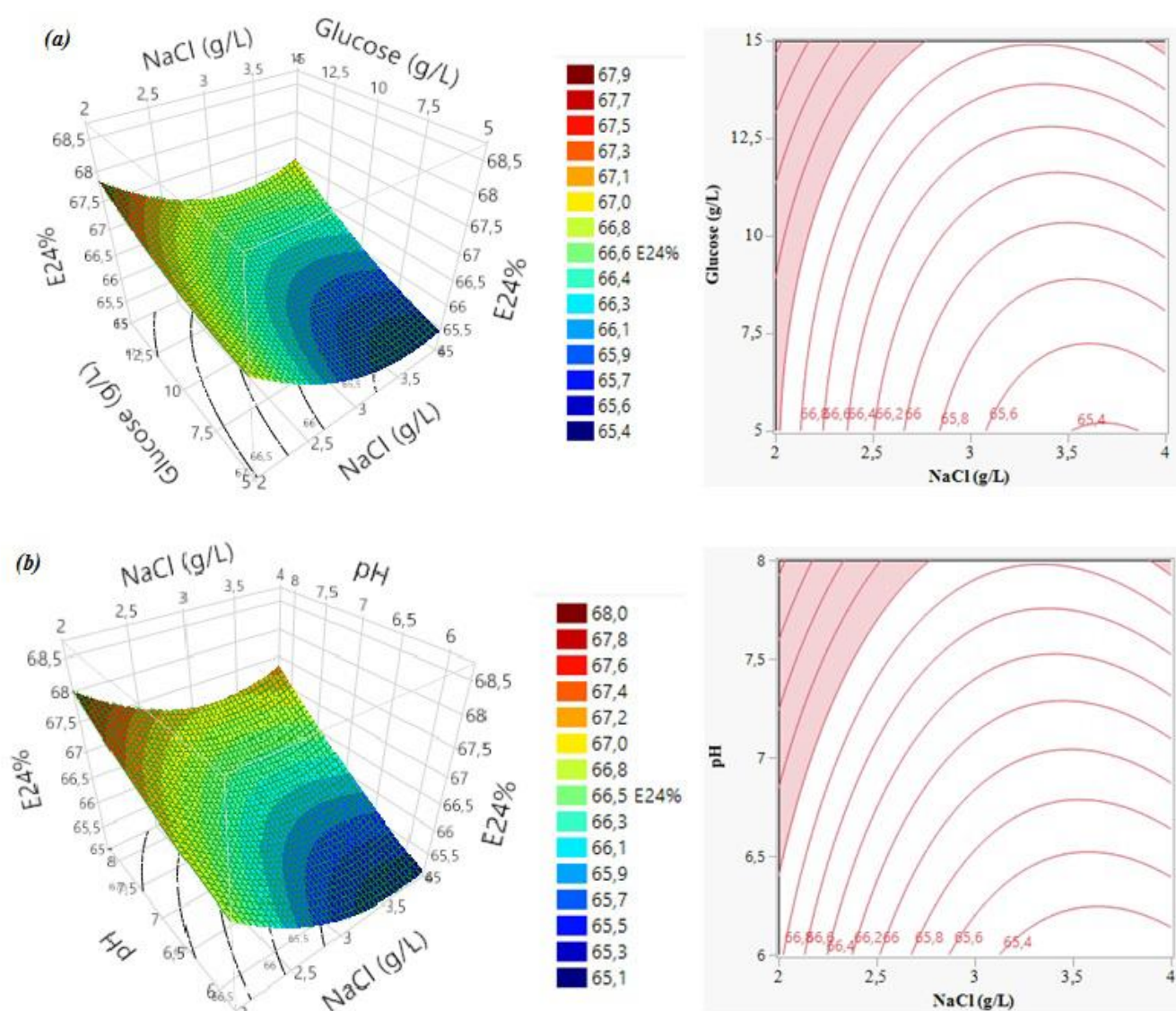
Le tracé de régression de l'activité d'émulsification expérimentale par rapport à l'activité d'émulsification prédite obtenue en résolvant l'équation ci-dessus est présenté sur la figure 40 qui a révélé un coefficient de détermination, R-Sq. (non ajustée) de 96,20 %, ce qui est en accord avec le R-Sq. (ajusté) qui est de 93,18 % pour le modèle dans le tableau (XV).



**Figure 40 :** Corrélation entre E<sub>24</sub> expérimentale et prédite par le modèle ajusté.

### VIII.2. Courbes de surface de réponse pour la production de biosurfactants

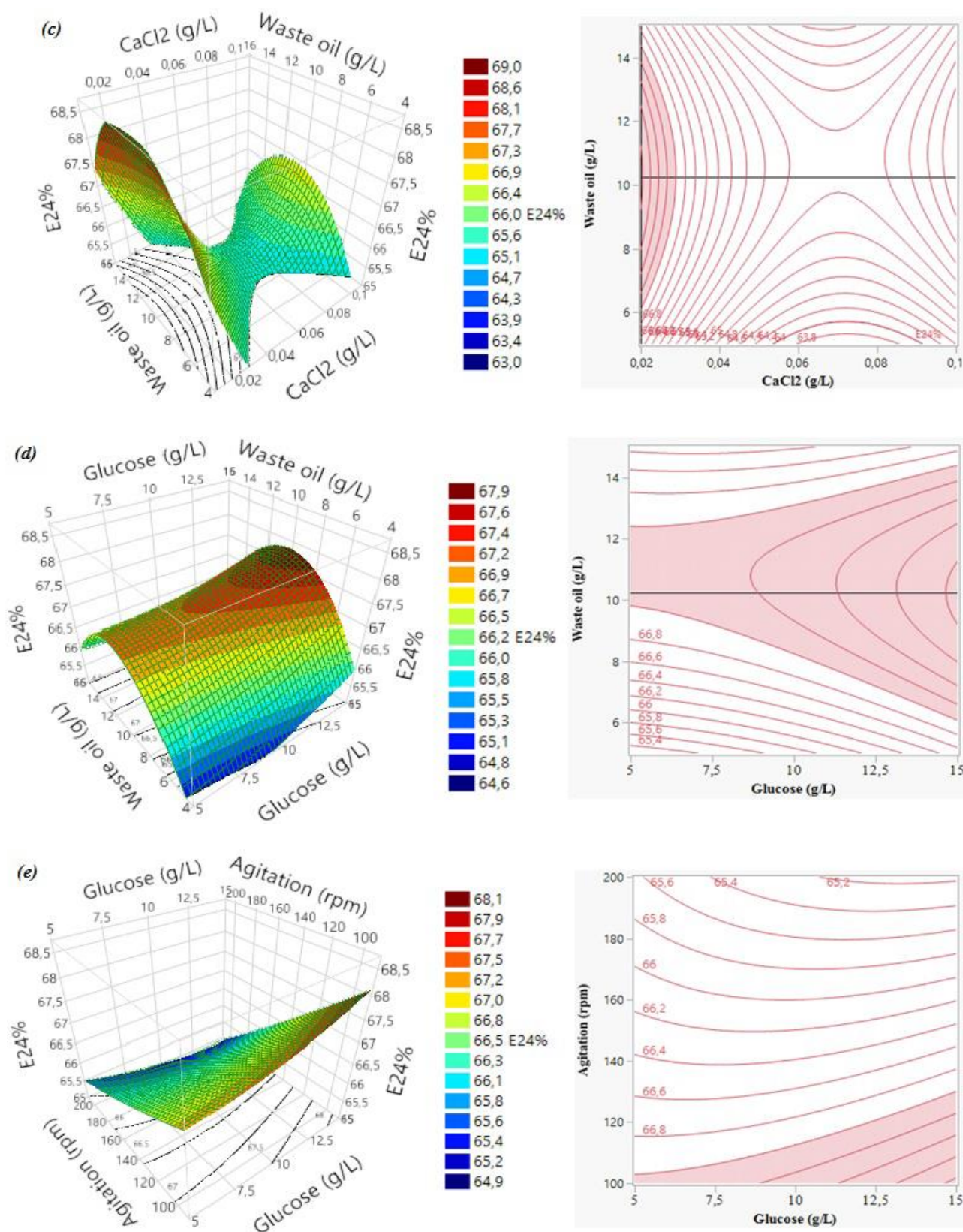
Afin de déterminer les niveaux optimaux de chaque variable pour une production maximale de biosurfactant BLA 2906, des tracés de surface de réponse tridimensionnelle construits en traçant la réponse (activité d'émulsification du biosurfactant) sur l'axe Z par rapport aux deux termes d'interaction les plus significatifs ( $X_1 \times X_3$ ,  $X_2 \times X_4$ ,  $X_3 \times X_4$ ,  $X_1 \times X_5$ ,  $X_5 \times X_6$ ,  $X_3 \times X_7$ ,  $X_5 \times X_7$ ), tout en maintenant les autres variables à leurs niveaux optimaux (Figure 41 a-g).



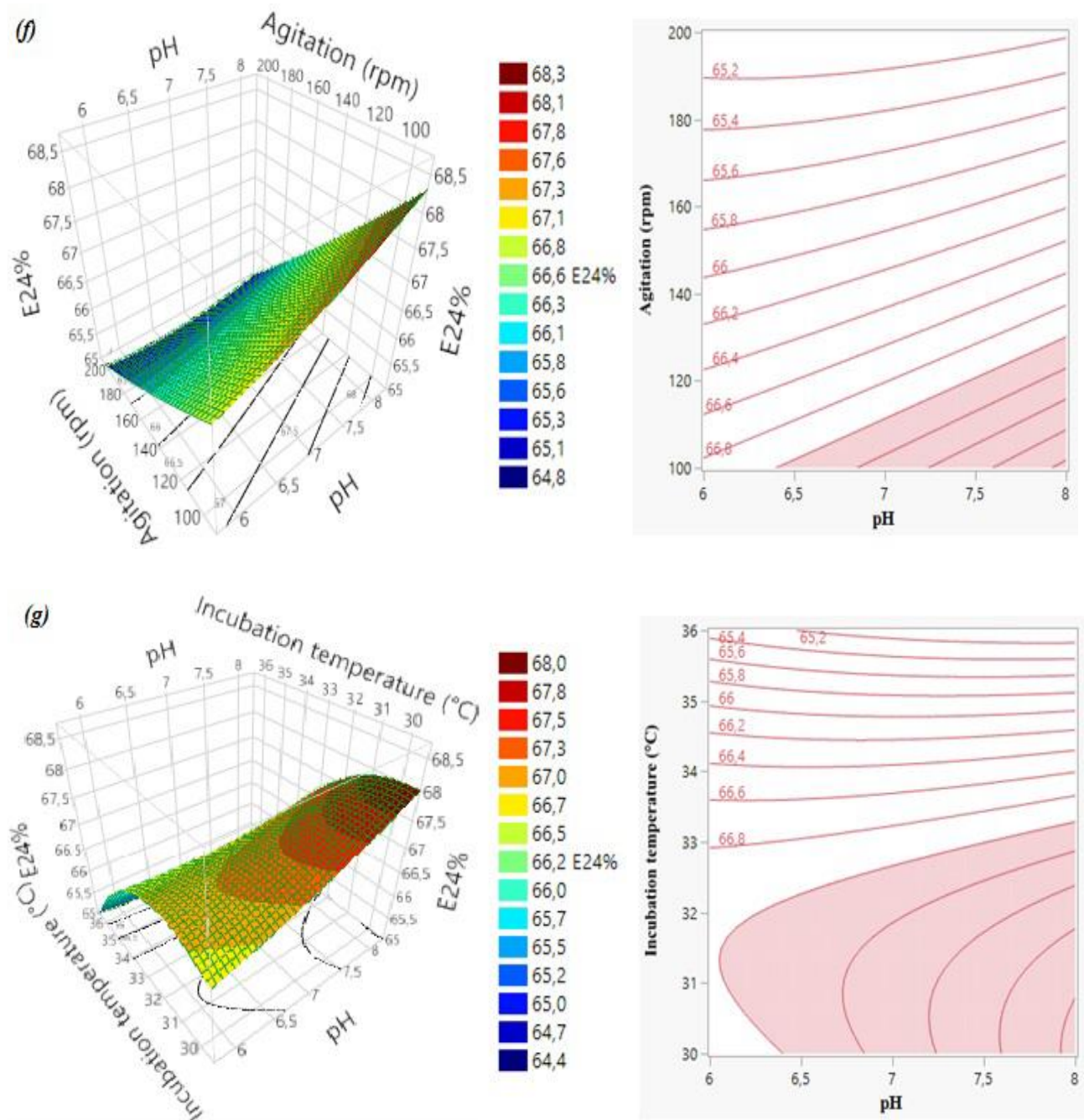
**Figure 41 :** Courbes 3D et 2D illustrant l'optimisation de la production BLA 2906.

Interactions entre (a) NaCl et glucose ; (b) NaCl et pH ; (c)  $\text{CaCl}_2$  et huiles usagées ; (d) glucose et huiles usagées ; (e) glucose et agitation ; (f) pH et température d'incubation ; (g) pH et agitation.

## Suite de la figure 41



## Suite de la figure 41



La forme du tracé de contour correspondant indique si l'interaction mutuelle entre les variables indépendantes est significative ou non. Comme le montre la figure 39 (a-g), chaque surface de réponse de Y (E24) indique un pic clair, ce qui signifie que le point optimal se trouve dans la limite de conception.

Les valeurs statistiques optimales des variables sont obtenues en se déplaçant le long des axes majeurs et mineurs du contour et la réponse en rouge sur la forme de chaque interaction représente l'activité d'émulsification maximale de la production du biosurfactant BLA 2906.

À partir de l'étude des tracés tridimensionnels (3D) de surface de réponse et des tracés de contour bidimensionnels (2D), les conditions optimales pour une productivité maximale du biosurfactant par *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906 (67,85 %) sont prédites à partir du modèle produit comme suit : 2 g /L pour NaCl, 0,02 g/L pour CaCl<sub>2</sub>, 15 g/L pour le glucose, 10,24 g/L pour les huiles usées, 8 pour le pH, 30 °C pour la température d'incubation et 100 tr/min pour l'agitation.

### **VIII.3. Validation du modèle**

La validation du modèle statistique est réalisée en effectuant des expériences avec le milieu optimisé, ces expériences sont effectuées dans des flacons sous agitation continue. Elles ont montré un rendement plus élevé du biosurfactant BLA 2906 avec une valeur d'activité d'émulsification ( $E_{24}$ ) de  $68,37 \pm 0,56$  % ; la valeur prédite est de 67,85 %. Ces résultats ont révélé une bonne corrélation entre les valeurs expérimentales prédites et réelles et la valeur expérimentale qui est assez proche de la valeur prédite, ce qui justifie la validité du modèle.

# *Conclusion*

### **Conclusion et perspectives**

Ce travail a permis d'étudier l'extraction de biosurfactant BLA 2906 produit par la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906, de mesurer par les différentes méthodes la capacité de production de biosurfactant, de déterminer ses profils chimique, biochimique et biologique et d'optimiser sa production.

Cette étude s'est intéressée d'abord à mesurer la capacité de production de biosurfactant BLA 2906 produit par la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906, après extraction. Le biosurfactant brut a montré des propriétés significatives telles qu'une activité d'émulsification élevée avec le pétrole ( $E_{24} = 63,11 \%$ ), un bon déplacement du pétrole (23,67 mm) et un effondrement positif des gouttes (Drop collapse). Par contre, cette biomolécule n'a pas présenté une activité hémolytique. Ce biosurfactant possède un rendement de 4,25 g/L.

Ensuite, l'étude est consacrée pour l'étude du profil chimique à savoir les teneurs en protéines et lipides, la caractérisation et l'analyse spectrale par FTIR du biosurfactant brut. La nature lipopeptidique de biosurfactant produit par la souche *Alcaligenes aquatilis* sont confirmés par les résultats obtenus. Les résultats de l'analyse MALDI TOF /MS ont montré que cette souche peut produire plusieurs types de lipopeptides, notamment des surfactines et des fengycines. L'analyse par spectrophotométrie de masse a permis de déterminer la structure chimique des fengycines A et B, produites par cette bactérie.

Le biosurfactant BLA 2906 est thermostable car il a conservé son activité d'émulsification après un traitement de 1 h à une température comprise entre 20 et 120 °C. La stabilité du biosurfactant BLA 2906 a montré un profil d'activité d'émulsification presque stable sur une large gamme de valeurs de pH (1 à 11) et sur différentes concentrations en sel (0 à 20 %).

L'activité antibactérienne de biosurfactant BLA 2906 a révélé des zones d'inhibition qui varient de 10,33 à 12,67 mm. L'activité antifongique du biosurfactant BLA 2906 a présenté des zones d'inhibition qui oscillent de 12,33 à 17,67 mm. En outre, le biosurfactant présente une activité anti-inflammatoire.

Le biosurfactant étudié possède une activité antioxydante testée avec 4 méthodes (pouvoir réducteur, test au phosphomolybdate et activités antiradicalaires). La capacité de biosorption des différents métaux lourds Cu, Fe, Pb, Cd, Zn, par le biosurfactant BLA 2906, a

enregistré, à un pH neutre (pH= 7), la meilleure biosorption avec un taux de 50 mg/g de BLA 2906 pour le plomb suivi par le fer puis le cuivre.

Le travail est complété par l'étude d'optimisation de la production du biosurfactant BLA 2906 par le plan d'expérience via le logiciel JMP en utilisant le plan de criblage Plackett-Burman avec 14 facteurs et le plan de surface de réponse. Il a permis de déterminer les facteurs affectants cette production ( $R^2 = 0,9969$ ). La composition optimale du milieu pour la production de biosurfactant BLA 2906 est la suivante en : NaCl (2 g/L),  $\text{CaCl}_2$  (0,02 g/L), glucose (15 g/L), huile usée (5 g/L), pH = 8, agitation (100 tr/min), incubation (température de 30 °C) et durée (7 jours).

A la lumière des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter cette étude par les approches plus approfondies, plusieurs perspectives peuvent être dégagées à savoir :

- La réalisation des expériences à partir de substrats à faible coût tels que l'huile de vidange, les sous-produits agroalimentaires, l'essence ou le gazoil vise à optimiser les paramètres de production des biosurfactants ainsi que les procédés de fermentation, à travers des protocoles expérimentaux appropriés.

- La production de biosurfactants dans des bioréacteurs à grande échelle dans la perspective d'améliorer les rendements de production en utilisant diverses matières moins coûteuses.

- Les résultats obtenus sur le biosurfactant BLA 2906 soulignent son potentiel prometteur en tant qu'agent multifonctionnel, notamment grâce à ses propriétés émulsifiantes, antioxydantes et thermostables. À l'avenir, il serait pertinent d'approfondir les études sur sa toxicité, sa biodégradabilité et sa stabilité dans des conditions industrielles variées. Par ailleurs, son intégration dans des formulations agroalimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques pourrait faire l'objet de développements appliqués, en vue d'une valorisation à l'échelle industrielle.

- Malgré les nombreuses possibilités d'application dans l'alimentation, de nombreuses études sont nécessaires pour obtenir une application fiable avec des performances fonctionnelles adéquates dans des matrices alimentaires complexes sous différentes conditions de transformation. Pour une application économiquement fiable, il est important de développer des stratégies utilisant ces biomolécules à la concentration la plus faible possible pour une performance maximale.

## *Références bibliographiques*

- Abdel-Mawgoud, A. M., Aboulwafa, M. M., & Hassouna, N. A. H. (2009).** Characterization of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157, 329-345.
- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., & Déziel, E. (2010).** Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1323-1336.
- Adu, S. A., Naughton, P. J., Marchant, R., & Banat, I. M. (2020).** Microbial biosurfactants in cosmetic and personal skincare pharmaceutical formulations. *Pharmaceutics*, 12(11), 1099.
- Ahamed, M. I., & Prasad, R. (2021).** Microbial biosurfactants: preparation, properties and applications. 1ère Ed; *Environmental and Microbial Biotechnology*, Singapore. P. 313.
- Akbari, S., Abdurahman, N.H., Yunus, R.M., Fayaz, F., & Alara, O.R. (2018).** Biosurfactants—a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*, 2(1), 81-90.
- Amaral, P. F. F., Da Silva, J. M., Lehocky, B. M., Barros-Timmons, A. M. V., Coelho, M. A. Z., Marrucho, I. M., & Coutinho, J. A. P. (2006).** Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 41(8), 1894-1898.
- Ananthi, S., Raghavendran, H. R. B., Sunil, A. G., Gayathri, V., Ramakrishnan, G., & Vasanthi, H. R. (2010).** In vitro antioxidant and in vivo anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (Marine Brown Alga). *Food and Chemical Toxicology*, 48(1), 187-192.
- Anyanwu, C. U., Obi, S. K. C., & Okolo, B. N. (2011).** Lipopeptide biosurfactant production by *Serratia marcescens* NSK-1 strain isolated from petroleum-contaminated soil. *Journal of Applied Sciences Research*, 79-87.
- Aparna, A., Srinikethan, G., & Hedge, S. (2011).** Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* ssp. on biodegradation of crude oil. *International Proceedings of Chemical, Biological & Environmental Engineering*, 6, 71-75.
- Aparna, A., Srinikethan, G., & Smitha, H. (2012).** Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 23-29.
- Ayed, H. B., Jemil, N., Maalej, H., Bayoudh, A., Hmidet, N., & Nasri, M. (2015).** Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 8-14.
- Bagad, Y. M., Umkar, A. R., Tatiya, A. U., & Surana, S. J. (2011).** Investigation of anti-inflammatory and analgesic activity of *Bridelia airyshawii* (Euphorbiaceae), 1326-1328
- Bak, F., Bonnicksen, L., Jørgensen, N. O., Nicolaisen, M. H., & Nybroe, O. (2015).** The biosurfactant viscosin transiently stimulates n-hexadecane mineralization by a bacterial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 1475-1483.

- Baker, S. C., & Chen, C. Y. (2010).** Enrichment and purification of lipopeptide biosurfactants. *Biosurfactants*, 281-288.
- Banat, I. M. (1995).** Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology*, 51(1), 1-12.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 495-508.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., & Marchant, R. (2010).** Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 427-444.
- Banat, I. M., De Rienzo, M. A. D., & Quinn, G. A. (2014).** Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 9915-9929.
- Barth, A., & Zscherp, C. (2002).** What vibrations tell about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(4), 369-430.
- Bernard, A. S., Clède, S., Emond, M., Monin-Soyer, H., & Quérard, J. (2023).** Techniques expérimentales en chimie-Classes prépas et concours-4e éd.: *Travaux Pratiques*. Dunod.
- Bezza, F. A., & Chirwa, E. M. N. (2015).** Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical Engineering Journal*, 101, 168-178.
- Bhardwaj, G., Cameotra, S. S., & Chopra, H. K. (2013).** Utilization of oleo-chemical industry by-products for biosurfactant production. *AMB Express*, 3(1), 1-5.
- Bhosale, H. J., Kadam, T. A., & Phulari, S. (2014).** Evaluation of antimicrobial activity and radical scavenging potential of lipopeptide biosurfactant from *Klebsiella pneumoniae* MSO-32. *Journal of Pharmacy Research*, 8(2), 139-143.
- Biniarz, P., Łukaszewicz, M., & Janek, T. (2017).** Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(3), 393-410.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipide extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917.
- Blois, M. S. (1958).** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.

- Brahmi, F., Mechri, B., Dabbou, S., Dhibi, M., & Hammami, M. (2012).** The efficacy of phenolics compounds with different polarities as antioxidants from olive leaves depending on seasonal variations. *Industrial Crops and Products*, 38, 146-152.
- Brahmi, F., Abdenour, A., Bruno, M., Silvia, P., Alessandra, P., Danilo, F., & Mohamed, C. (2016).** Chemical composition and in vitro antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, 96-105.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bullen, J. J., Rogers, H. J., Spalding, P. B., & Ward, C. G. (2005).** Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 43(3), 325-330.
- Buxton, R. (2005).** Blood agar plates and hemolysis protocols. *American Society for Microbiology*, 1-9.
- Calado, V. M. A., & Montgomery, D. C. (2003).** Design of Experiments using Statistica. *E-papers, Rio de Janeiro, Brazil*.
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (1998).** Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 520-529.
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (2004).** Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 7(3), 262-266.
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (2010).** Biosurfactant-enhanced bioremediation of hydrophobic pollutants. *Pure and Applied Chemistry*, 82(1), 97-116.
- Campos, J. M., Montenegro Stamford, T. L., Sarubbo, L. A., de Luna, J. M., Rufino, R. D., & Banat, I. M. (2013).** Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*, 29(5), 1097-1108.
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I., & Giulietti, A. M. (1996).** Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 82-84.
- Chakraborty, J., & Das, S. (2014).** Biosurfactant-based bioremediation of toxic metals. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 167-201.
- Chandra, S., Dey, P., & Bhattacharya, S. (2012).** Preliminary in vitro assessment of anti-inflammatory property of *Mikania scandens* flower extract. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, 2(1), 25-31.
- Chandran, P. R. E. E. T. H. Y., & Das, N. (2010).** Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species *Trichosporon asahii* isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal on Engineering, Science and Technology*, 2(12), 6942-6953.

- Chang, C. C., Chen, W. C., Ho, T. F., Wu, H. S., & Wei, Y. H. (2011).** Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 111(5), 501-511.
- Chen, W. C., Juang, R. S., & Wei, Y. H. (2015).** Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158-169.
- Chen, W., Kong, Y., Li, J., Sun, Y., Min, J., & Hu, X. (2020).** Enhanced biodegradation of crude oil by constructed bacterial consortium comprising salt-tolerant petroleum degraders and biosurfactant producers. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 154, 105047.
- Cheng, Y., He, H., Yang, C., Yan, Z., Zeng, G., & Qian, H. (2016).** Effects of anionic surfactant on n-hexane removal in biofilters. *Chemosphere*, 150, 248-253.
- Chong, H., & Li, Q. (2017).** Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1-12.
- Chouvenc, P., Vessot, S., Andrieu, J., & Vacus, P. (2004).** Optimization of the freeze-drying cycle: a new model for pressure rise analysis. *Drying Technology*, 22(7), 1577-1601.
- Coelho, A. L. S., Feuser, P. E., Carciofi, B. A. M., de Oliveira, D., & de Andrade, C. J. (2020).** Biological activity of mannosylerythritol lipids on the mammalian cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(20), 8595-8605.
- Colthup, N. (2012).** *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. Elsevier. Ed Academic Press. New York. p. 511.
- Coronel-León, J., de Grau, G., Grau-Campistany, A., Farfan, M., Rabanal, F., Manresa, A., & Marqués, A. M. (2015).** Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. *Annals of Microbiology*, 65(4), 2065-2078.
- Coronel-León, J., Marqués, A. M., Bastida, J., & Manresa, A. (2016).** Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 99-111.
- Dang, H., & Lovell, C. R. (2016).** Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 91-138.
- Dang, Y., Zhao, F., Liu, X., Fan, X., Huang, R., Gao, W., & Yang, C. (2019).** Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 1-14.
- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008a).** Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1675-1684.

- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008b).** Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. *Chemosphere*, 72(9), 1229-1234.
- De Beer, D., Sauter, E., Niemann, H., Kaul, N., Foucher, J. P., Witte, U., & Boetius, A. (2006).** In situ fluxes and zonation of microbial activity in surface sediments of the Håkon Mosby Mud Volcano. *Limnology and Oceanography*, 51(3), 1315-1331.
- De Oliveira, M. R., Magri, A., Baldo, C., Camilios-Neto, D., Minucelli, T., & Celligoi, M. A. P. C. (2015).** Sophorolipids A promising biosurfactant and it's applications. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 6(2), 161-174.
- De Marco, E., Savarese, M., Paduano, A., & Sacchi, R. (2007).** Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. *Food Chemistry*, 104(2), 858-867.
- De Sousa, T., & Bhosle, S. (2012).** Isolation and characterization of a lipopeptide bioemulsifier produced by *Pseudomonas nitroreducens* TSB. MJ10 isolated from a mangrove ecosystem. *Bioresource Technology*, 123, 256-262.
- Debbabi, M., Nury, T., Zarrouk, A., Mekahli, N., Bezine, M., Sghaier, R., ... & Lizard, G. (2016).** Protective effects of  $\alpha$ -tocopherol,  $\gamma$ -tocopherol and oleic acid, three compounds of olive oils, and no effect of trolox, on 7-ketocholesterol-induced mitochondrial and peroxisomal dysfunction in microglial BV-2 cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1973.
- Dell'Anno, F., Sansone, C., Ianora, A., & Dell'Anno, A. (2018).** Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. *Marine Environmental Research*, 137, 196-205.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997).** Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.
- Dhanya, M. S. (2021).** Biosurfactant-enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbons: Potential issues, challenges, and future prospects. *Bioremediation for Environmental Sustainability*, 215-250.
- Dubeau, D., Déziel, E., Woods, D. E., & Lépine, F. (2009).** Burkholderia thailandensis harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC Microbiology*, 9(1), 1-12.
- Durval, I. J., Ribeiro, B. G., Aguiar, J. S., Rufino, R. D., Converti, A., & Sarubbo, L. A. (2021).** Application of a biosurfactant produced by *Bacillus cereus* UCP 1615 from waste frying oil as an emulsifier in a cookie formulation. *Fermentation*, 7(3), 189.
- Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Younes, S. B., Cherif, S., Ferhat, S., & Sayadi, S. (2012).** Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of Basic Microbiology*, 52(4), 408-418.

- Emtiazi, G., Saleh, T., & Hassanshahian, M. (2009).** The effect of bacterial glutathione S-transferase on morpholine degradation. *Biotechnology Journal*, 4(2), 202-205.
- Epstein, I. R., & Vanag, V. K. (2003).** Spatiotemporal Pattern Formation and Chaos in the Belousov-Zhabotinsky Reaction in a Reverse Microemulsion. In *AIP Conference Proceedings*, 676(1), 265-274. American Institute of Physics.
- Fenibo, E. O., Douglas, S. I., & Stanley, H. O. (2019).** A review on microbial surfactants: production, classifications, properties and characterization. *Journal of Advances in Microbiology*, 18(3), 1-22.
- Fernandes, P. A. V., Arruda, I. R. D., Santos, A. F. A. B. D., Araújo, A. A. D., Maior, A. M. S., & Ximenes, E. A. (2007).** Antimicrobial activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 704-709.
- Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T. J., & Banat, I. M. (2010).** Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(6), 617-627.
- George, S., & Jayachandran, K. (2013).** Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology*, 114(2), 373-383.
- Geudens, N., & Martins, J. C. (2018).** Cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* spp.—biological swiss-army knives. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1867.
- Geys, R., Soetaert, W., & Van Bogaert, I. (2014).** Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 66-72.
- Gharaei-Fathabad, E. (2011).** Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(1), 58-69.
- Ghurye, G. L., Vipulanandan, C., & Willson, R. C. (1994).** A practical approach to biosurfactant production using nonaseptic fermentation of mixed cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 44(5), 661-666.
- Giri, S. S., Ryu, E., Sukumaran, V., & Park, S. C. (2019).** Antioxidant, antibacterial, and anti-adhesive activities of biosurfactants isolated from *Bacillus* strains. *Microbial Pathogenesis*, 132, 66-72.
- González-Jaramillo, L. M., Aranda, F. J., Teruel, J. A., Villegas-Escobar, V., & Ortiz, A. (2017).** Antimycotic activity of fengycin C biosurfactant and its interaction with phosphatidylcholine model membranes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 156, 114-122.
- Gudiña, E. J., Fernandes, E. C., Rodrigues, A. I., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2015).** Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. *Frontiers in Microbiology*, 6, 59.

- Hackett, J. A., & Brennan, P. J. (1975).** The mannophosphoinositides of *Corynebacterium aquaticum*. *Biochemical Journal*, 148(2), 253-258.
- Hassanshahian, M. (2014).** Isolation and characterization of biosurfactant producing bacteria from Persian Gulf (Bushehr provenance). *Marine Pollution Bulletin*, 86(1-2), 361-366.
- Hathout, Y., Ho, Y. P., Ryzhov, V., Demirev, P., & Fenselau, C. (2000).** Kurstakins: a new class of Lipopeptides isolated from *Bacillus t huringiensis*. *Journal of Natural Products*, 63(11), 1492-1496.
- Heinemann, C., van Hylckama Vlieg, J. E., Janssen, D. B., Busscher, H. J., van der Mei, H. C., & Reid, G. (2000).** Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 that inhibits adhesion of *Enterococcus faecalis* 1131. *FEMS Microbiology Letters*, 190(1), 177-180.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005).** The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Hussain, S. Z., Maqbool, K., & Naseer, B. (2019).** High performance thin layer chromatography: Principle, working and applications. *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3), 83-88.
- Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., & Trevors, J. T. (1991).** A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13(4), 271-279.
- Jana, S., Mondal, S., & Kulkarni, S. S. (2017).** Chemical synthesis of biosurfactant succinoyl trehalose lipids. *Organic Letters*, 19(7), 1784-1787.
- Janek, T., Łukaszewicz, M., Rezanka, T., & Krasowska, A. (2010).** Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresource Technology*, 101(15), 6118-6123.
- Janek, T., Łukaszewicz, M., & Krasowska, A. (2013).** Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 110, 379-386.
- Jemil, N., Hmidet, N., Ayed, H. B., & Nasri, M. (2018).** Physicochemical characterization of *Enterobacter cloacae* C3 lipopeptides and their applications in enhancing diesel oil biodegradation. *Process Safety and Environmental Protection*, 117, 399-407.
- Joshi, S., Bharucha, C., & Desai, A. J. (2008).** Production of biosurfactant and antifungal compound by fermented food isolate *Bacillus subtilis* 20B. *Bioresource Technology*, 99(11), 4603-4608.
- Joy, S., Rahman, P. K., & Sharma, S. (2017).** Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317, 232-241.

- Kaczorek, E., Pacholak, A., Zdarta, A., & Smulek, W. (2018).** The impact of biosurfactants on microbial cell properties leading to hydrocarbon bioavailability increase. *Colloids and Interfaces*, 2(3), 35.
- Kalyani, R. R., Corriere, M., & Ferrucci, L. (2014).** Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(10), 819-829.
- Kandikattu, K., Kumar, P. B. R., Priya, R. V., Kumar, K. S., & Rathore, R. S. B. (2013).** Evaluation of anti-inflammatory activity of *Canthium parviflorum* by in-vitro method. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology*, 1(5), 729-731.
- Kanlayavattanakul, M., & Lourith, N. (2010).** Lipopeptides in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 32(1), 1-8.
- Khaled, E., & Aboul-Enein, H. Y. (2015).** Surfactants. Environmental analysis by electrochemical sensors and biosensors, *Nanostructure Science and Technology*. Springer, New York, NY, 905-930.
- Khopade, A., Ren, B., Liu, X. Y., Mahadik, K., Zhang, L., & Kokare, C. (2012).** Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *Journal of Colloid and Interface Science*, 367(1), 311-318.
- Kim, H. S., Jeon, J. W., Kim, B. H., Ahn, C. Y., Oh, H. M., & Yoon, B. D. (2006).** Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 391-396.
- Korayem, L., Khorsid, M., & Kassem, S. S. (2015).** Using grey wolf algorithm to solve the capacitated vehicle routing problem. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 83(1), 012014.
- Kosaric, N., & Sukan, F. V. (Eds.). (2014).** *Biosurfactants: production and utilization—processes, technologies, and economics* (Vol. 159). CRC press.
- Kretschmer, A., Bock, H., & Wagner, F. (1982).** Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(4), 864-870.
- Kuczajowska-Zadrożna, M., Filipkowska, U., & Józwiak, T. (2015).** Application of biosurfactants for heavy metals leaching from immobilized activated sludge. *Archives of Environmental Protection*, 41(1), 43-52.
- Kulakovskaya, E., Baskunov, B., & Zvonarev, A. (2014).** The antibiotic and membrane-damaging activities of cellobiose lipids and sophorose lipids. *Journal of Oleo Science*, 63(7), 701-707.
- Kumar, M. A. N. O. J., Leon, V. L. A. D. I. M. I. R., & Ilzins, O. A. (2006).** Enhancement of oil degradation by co-culture of hydrocarbon degrading and biosurfactant producing bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 55(2), 139.

- Kuyukina, M. S., & Ivshina, I. B. (2010).** Rhodococcus biosurfactants: biosynthesis, properties, and potential applications. In *Biology of rhodococcus*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 291-313
- Laabei, M., Jamieson, W. D., Lewis, S. E., Diggle, S. P., & Jenkins, A. T. A. (2014).** A new assay for rhamnolipid detection—important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7199-7209.
- Li, Q., & Elimelech, M. (2004).** Organic fouling and chemical cleaning of nanofiltration membranes: measurements and mechanisms. *Environmental Science & Technology*, 38(17), 4683-4693.
- Lin, H., Zhou, M., Li, B., & Dong, Y. (2023).** Mechanisms, application advances and future perspectives of microbial-induced heavy metal precipitation: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 178, 105544.
- Liu, W. J., Duan, X. D., Wu, L. P., & Masakorala, K. (2018).** Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* SNP0614 and its Effect on Biodegradation of Petroleum. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(2), 155-162.
- Loiseau, C., Portier, E., Corre, M. H., Schlusshuber, M., Depayras, S., Berjeaud, J. M., & Verdon, J. (2018).** Highlighting the potency of biosurfactants produced by *Pseudomonas* strains as anti-*Legionella* agents. *BioMed Research International*, 2018(1), 8194368.
- Luna, J. M., Rufino, R. D., & Sarubbo, L. A. (2016).** Biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP0995 exhibiting heavy metal remediation properties. *Process Safety and Environmental Protection*, 102, 558-566.
- Luong, T. M., Ponamareva, O. N., Nechaeva, I. A., Petrikov, K. V., Delegan, Y. A., Surin, A. K., & Filonov, A. E. (2018).** Characterization of biosurfactants produced by the oil-degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* S67 at low temperature. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(2), 1-10.
- Maalej, H., Hmidet, N., Boisset, C., Bayma, E., Heyraud, A., & Nasri, M. (2016).** Rheological and emulsifying properties of a gel-like exopolysaccharide produced by *Pseudomonas stutzeri* AS22. *Food Hydrocolloids*, 52, 634-647.
- Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (1997).** Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18(1), 37-42.
- Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (1998).** Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(1), 48-52.
- Makkar, R. S., & Rockne, K. J. (2003).** Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 22(10), 2280-2292.

- Maneerat, S., & Phetrong, K. (2007).** Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 29(3), 781-791.
- Mao-Cheng, D., Jing, L., Fu-Rui, L., Meisheng, Y., Xiao-Ming, X., Jian-Ping, Y., Juan, P., Chou-Fei, W., Jiang-Hai, W. (2014).** Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Marine Pollution Bulletin*. 83(1),79-86.
- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004).** Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *Médecine/Sciences*, 20(4), 458-463.
- Markande, A. R., Patel, D., & Varjani, S. (2021).** A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technology*, 330, 124963.
- Mata-Sandoval, J. C., Karns, J., & Torrents, A. (2000).** Effect of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on the solubilization of pesticides. *Environmental Science and Technology*, 34(23), 4923-4930.
- Md, F. (2012).** Biosurfactant: production and application. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*, 3(4), 124.
- Meena, K. R., & Kanwar, S. S. (2015).** Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents: applications in food safety and therapeutics. *BioMed research international*, (1), 473050.
- Mireles, J. R., Toguchi, A., & Harshey, R. M. (2001).** Salmonella enterica serovar Typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183(20), 5848-5854.
- Mishra, M., Muthuprasanna, P., Prabha, K. S., Rani, P. S., Babu, I. S., Chandiran, I. S., & Shalini, S. (2009).** Basics and potential applications of surfactants-a review. *International Journal of Pharmtech Research*, 1(4), 1354-1365.
- Mishra, S., Lin, Z., Pang, S., Zhang, Y., Bhatt, P., & Chen, S. (2021).** Biosurfactant is a powerful tool for the bioremediation of heavy metals from contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 418, 126253.
- Mizushima, Y., & Kobayashi, M. (1968).** Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(3), 169-173.
- Mnif, I., & Ghribi, D. (2015).** Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Peptide Science*, 104(3), 129-147.
- Mnif, I., Sahnoun, R., Ellouz-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2017).** Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. *Process Safety and Environmental Protection*, 109, 72-81.

**Mnif, I., Ellouz-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2018).** Glycolipid biosurfactants, main classes, functional properties and related potential applications in environmental biotechnology. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(5), 2192-2206.

**Molyneux, P. (2004).** The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.

**Montgomery, R. (2002).** *A tour of subriemannian geometries, their geodesics and applications*. American Mathematical Society, 91.

**Morais, I. M. C., Cordeiro, A. L., Teixeira, G. S., Domingues, V. S., Nardi, R. M. D., Monteiro, A. S., & Santos, V. L. (2017).** Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P6A and *Lactobacillus gasseri* P65. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 1-15.

**Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000).** A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218.

**Mukherjee, S., Das, P., Sivapathasekaran, C., & Sen, R. (2008).** Enhanced production of biosurfactant by a marine bacterium on statistical screening of nutritional parameters. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 254-260.

**Müller, M. M., Kügler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hörmann, B., Pöhnlein, M., & Hausmann, R. (2012).** Rhamnolipids—next generation surfactants? *Journal of Biotechnology*, 162(4), 366-380.

**Mulligan, C. N., Sharma, S. K., Mudhoo, A., & Makhijani, K. (2014).** Green chemistry and biosurfactant research. *Biosurfactants Research Trends and Applications*, 1-22.

**Munier, R. L. (1968).** La chromatographie sur couche mince : Principes et possibilités. *Qualitas Plantarum et Materiae Vegetabiles*, 16(1-4), 12-34.

**Nadell, C. D., Drescher, K., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2015).** Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms. *The ISME Journal*, 9(8), 1700-1709.

**Ndlovu, T., Rautenbach, M., Vosloo, J. A., Khan, S., & Khan, W. (2017).** Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *Amb Express*, 7, 1-19.

**Nikolova, C., & Gutierrez, T. (2021).** Biosurfactants and their applications in the oil and gas industry: current state of knowledge and future perspectives. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 626-639.

**Noparat, P., Maneerat, S., & Saimmai, A. (2014).** Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of

*Ochrobactrum anthropi* 2/3. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 865-877.

**Nurfarahin, A. H., Mohamed, M. S., & Phang, L. Y. (2018).** Culture medium development for microbial-derived surfactants production—an overview. *Molecules*, 23(5), 1049.

**Obayori, O. S., Ilori, M. O., Adebuseye, S. A., Oyetibo, G. O., Omotayo, A. E., & Amund, O. O. (2009).** Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 1615-1623.

**Obinaju, B. E., & Martin, F. L. (2016).** ATR-FTIR spectroscopy reveals polycyclic aromatic hydrocarbon contamination despite relatively pristine site characteristics: results of a field study in the Niger Delta. *Environment International*, 89, 93-101.

**Ohadi, M., Shahravan, A., Dehghannoudeh, N., Eslaminejad, T., Banat, I. M., & Dehghannoudeh, G. (2020).** Potential use of microbial surfactant in microemulsion drug delivery system: a systematic review. *Drug design, development and therapy*, 541-550.

**Pacwa-Płociniczak, M., Plaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011).** Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(1), 633-654.

**Pathak, K. V., Keharia, H., Gupta, K., Thakur, S. S., & Balaram, P. (2012).** Lipopeptides from the banyan endophyte, *Bacillus subtilis* K1: mass spectrometric characterization of a library of fengycins. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 23(10), 1716-1728.

**Patowary, K., Saikia, R. R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2015).** Degradation of polyaromatic hydrocarbons employing biosurfactant-producing *Bacillus pumilus* KS2. *Annals of Microbiology*, 65(1), 225-234.

**Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C., & Deka, S. (2017).** Characterization of biosurfactant produced during degradation of hydrocarbons using crude oil as sole source of carbon. *Frontiers in Microbiology*, 8, 279.

**Pecci, Y., Rivardo, F., Martinotti, M. G., & Allegrone, G. (2010).** LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *Journal of Mass Spectrometry*, 45(7), 772-778.

**Pereira, J. F., Gudiña, E. J., Costa, R., Vitorino, R., Teixeira, J. A., Coutinho, J. A., & Rodrigues, L. R. (2013).** Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. *Fuel*, 111, 259-268.

**Perfumo, A., Rancich, I., & Banat, I. M. (2010).** Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. *Biosurfactants*, 135-145.

- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., & Wallach, J. (1999).** Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 553-563.
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946).** The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*. 33, 305–325.
- Plaza, G. A., Zjawiony, I., & Banat, I. M. (2006).** Use of different methods for detection of thermophilic biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated and bioremediated soils. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 50(1), 71-77.
- Poirier, A., Ozkaya, K., Gredziak, J., Talbot, D., & Baccile, N. (2023).** Heavy metal removal from water using the metallogelation properties of a new glycolipid biosurfactant. *Journal of Surfactants and Detergents*, 26(2), 175-184.
- Qi, X., Dho, J., Tomov, R., Blamire, M. G., & MacManus-Driscoll, J. L. (2005).** Greatly reduced leakage current and conduction mechanism in aliovalent-ion-doped BiFeO<sub>3</sub>. *Applied Physics Letters*, 86(6).
- Rahal, J. J (2006).** Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species*. *Clinical Infectious Diseases*, 43(Supplement 2), S95-S99.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2002).** Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology Progress*, 18(6), 1277-1281.
- Rahman, P. K., & Gakpe, E. (2008).** Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. *Biotechnology*.
- Rani, A. A., Punitha, S. M. J., & Rema, M. (2014).** Anti-inflammatory activity of flower extract of *Cassia auriculata*-an in-vitro study. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences*, 4(1), 57-60.
- Raza, W., Lee, J., Raza, N., Luo, Y., Kim, K. H., & Yang, J. (2019).** Removal of phenolic compounds from industrial waste water based on membrane-based technologies. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 71, 1-18.
- Raza, S. H. A., Shah, S. Z. A., & Muhammad, N. (2020).** Biosurfactants: Production, properties, and applications in the pharmaceutical industry. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 936-948.
- Rodrigues, M. I., & Lemma, A. F. (2009).** Design of experiments and optimization of processes. *Campinas, Brazil: Cárita Ed*, 238.
- Ron, E.Z., & Rosenberg, E. (2014).** Natural Roles of Biosurfactants. *Environmental Microbiology*, 16(6), 1410-1427.
- Roy, A. (2017).** Review on the biosurfactants: properties, types and its applications. *Journal of Fundamentals of Renewable Energy and Applications*, 8, 1-14.

- Rufino, R. D., Luna, J. M., Campos-Takaki, G. M., Ferreira, S. R., & Sarubbo, L. A. (2012). Application of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* in the remediation of heavy metals. *Chemical Engineering*, 27, 61-66.
- Sachdev, D. P., & Cameotra, S. S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(3), 1005-1016.
- Sahreen, S., Khan, M.R., Ali Khan, R. (2010). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of *Carissa opaca* fruits. *Food Chemistry*, 122, 1205–1211
- Saimmai, A., Riansa-Ngawong, W., Maneerat, S., & Dikit, P. (2020). Application of biosurfactants in the medical field. *Walailak Journal of Science and Technology (WJST)*, 17(2), 154-166.
- Sajna, K. V., Sukumaran, R. K., Jayamurthy, H., Reddy, K. K., Kanjilal, S., Prasad, R. B., & Pandey, A. (2013). Studies on biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 and their potential application as laundry detergent additives. *Biochemical Engineering Journal*, 78, 85-92.
- Salam, P.S., Pranjali, B., & Bolin, K.K. (2013). Optimization of Nutrient Requirements and Culture Conditions for the Production of Rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 7815 using Mesua ferrea Seed Oil. *Indian Journal of Microbiology*.53(4), 467-476.
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., & Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3), 401.
- Sarubbo, L. A., Rocha Jr, R. B., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., & Banat, I. M. (2015). Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. *Chemistry and Ecology*, 31(8), 707-723.
- Sarubbo, L. A., Maria da Gloria, C. S., Durval, I. J. B., Bezerra, K. G. O., Ribeiro, B. G., Silva, I. A., & Banat, I. M. (2022). Biosurfactants: Production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, 181, 108377.
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30(2), 127-144.
- Satpute, S. K., Zinjarde, S. S., & Banat, I. M. (2018). Recent updates on biosurfactants in the food industry. *Microbial Cell Factories*, 1-20.
- Schlüsselhuber, M., Godard, J., Sebban, M., Bernay, B., Garon, D., Seguin, V., & Desmaures, N. (2018). Characterization of milkisin, a novel lipopeptide with antimicrobial properties produced by *Pseudomonas* sp. UCMA 17988 isolated from bovine raw milk. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1030.
- Schubert, K. V., Strey, R., & Kahlweit, M. (1992). Similarities of aqueous and nonaqueous microemulsions. *Trends in Colloid and Interface Science* VI, 263-267.

- Seifried, R. M., Harrison, E., & Seifried, H. E. (2017).** Antioxidants in health and disease. In *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease* (pp. 321-346). Academic Press.
- Shah, N., Nikam, R., Gaikwad, S., Sapre, V., & Kaur, J. (2016).** Biosurfactant: types, detection methods, importance and applications. *Indian Journal of Microbiology Research*, 3(1), 5-10.
- Sharma, D., Ansari, M. J., Al-Ghamdi, A., Adgaba, N., Khan, K. A., Pruthi, V., & Al-Waili, N. (2015).** Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* DSVP20 isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil and its physicochemical characterization. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 17636-17643.
- Sharma, D., Ansari, M. J., Gupta, S., Al Ghamdi, A., Pruthi, P., & Pruthi, V. (2016a).** Structural characterization and antimicrobial activity of a biosurfactant obtained from *Bacillus pumilus* DSVP18 grown on potato peels. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(9).
- Sharma, D., & Saharan, B. S. (2016b).** Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnology Reports*, 11, 27-35.
- Shavandi, M., Mohebbali, G., Haddadi, A., Shakarami, H., & Nuhi, A. (2011).** Emulsification potential of a newly isolated biosurfactant-producing bacterium, *Rhodococcus* sp. strain TA6. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(2), 477-482.
- Shu, Q., Wu, J., & Chen, Q. (2019).** Synthesis, characterization of liposomes modified with biosurfactant MEL-A loading betulinic acid and its anticancer effect in HepG2 cell. *Molecules*, 24(21), 3939.
- Shuhong, Y., Meiping, Z., Hong, Y., Han, W., Shan, X., Yan, L., & Jihui, W. (2014).** Biosorption of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cr}^{6+}$  by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter* ps-5. *Carbohydrate Polymers*, 101, 50-56.
- Silva, N. R. A., Luna, M. A., Santiago, A. L., Franco, L. O., Silva, G. K., De Souza, P. M., & Campos-Takaki, G. M. (2014).** Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from caatinga soil in the northeast of Brazil. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15377-15395.
- Silva, S. N. R. L., Farias, C. B. B., Rufino, R. D., Luna, J. M., & Sarubbo, L. A. (2010).** Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(1), 174-183.
- Silverstein, R. M., & Bassler, G. C. (1962).** Spectrometric identification of organic compounds. *Journal of Chemical Education*, 39(11), 546.
- Singh, P., & Cameotra, S. S. (2004).** Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(2), 291-297.

**Singh, A. K., & Cameotra, S. S. (2013).** Efficiency of lipopeptide biosurfactants in removal of petroleum hydrocarbons and heavy metals from contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 7367-7376.

**Singh, G. B., Gupta, S., & Gupta, N. (2013).** Carbazole degradation and biosurfactant production by newly isolated *Pseudomonas* sp. strain GBS. 5. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 35-43.

**Singh, R., Glick, B. R., & Rathore, D. (2018).** Biosurfactants as a biological tool to increase micronutrient availability in soil: A review. *Pedosphere*, 28(2), 170-189.

**Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., & Sen, R. (2010).** Optimization of a marine medium for augmented biosurfactant production. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 8(1).

**Slimani, K., Pirotais, Y., Maris, P., Abjean, J. P., & Hurtaud-Pessel, D. (2018).** Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the analysis of N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropane-1, 3-diamine, a biocidal disinfectant, in dairy products. *Food Chemistry*, 262, 168-177.

**Smyth, T., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. (2010).** Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, 3688-3704.

**Smyth, T. J., Rudden, M., Tsaousi, K., Marchant, R., Banat, I. M. (2014).** Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols: Biochemical Methods*, 29-60.

**Soberón-Chávez, G., Lépine, F., & Déziel, E. (2005).** Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 718-725.

**Sobrinho, H. B., Luna, J. M., Rufino, R. D., Porto, A. L. F., & Sarubbo, L. A. (2013).** Biosurfactants: classification, properties and environmental applications. *Recent Developments in Biotechnology*, 11(14), 1-29.

**Sousa, M., Dantas, I. T., Feitosa, F. X., Alencar, A. E. V., Soares, S. A., Melo, V. M. M., & Sant'ana, H. B. (2014).** Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil/biosurfactant/water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 31, 613-623.

**Sriram, M. I., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracerosepat, R., Srisakthi, K., & Gurunathan, S. (2011).** Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 174-181.

**Stella, N. C., Clare, E., Gladys, A., Nonyelum, A. V., Nkiru, M., & Amaechi, E. (2023).** Isolation and screening of biosurfactant-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated soils in awka, southeast, Nigeria. *Microbiology Research Journal International*, 33(10), 9-19.

- Symmank, H., Franke, P., Saenger, W., & Bernhard, F. (2002).** Modification of biologically active peptides: production of a novel lipohexapeptide after engineering of *Bacillus subtilis* surfactin synthetase. *Protein engineering*, 15(11), 913-921.
- Thavasi, R., Jayalakshmi, S., Balasubramanian, T., & Banat, I. M. (2007).** Biosurfactant production by *Corynebacterium kutscheri* from waste motor lubricant oil and peanut oil cake. *Letters in Applied Microbiology*, 45(6), 686-691.
- Twigg, M. S., Baccile, N., Banat, I. M., Déziel, E., Marchant, R., Roelants, S., & Van Bogaert, I. N. (2021).** Microbial biosurfactant research: time to improve the rigour in the reporting of synthesis, functional characterization and process development. *Microbial Biotechnology*, 14(1), 147-170.
- Usman, M. M., Dadrasnia, A., Lim, K. T., Mahmud, A. F., & Ismail, S. (2016).** Application of biosurfactants in environmental biotechnology; remediation of oil and heavy metal. *AIMS Bioengineering*, 3(3), 289-304.
- Vandecasteele, J. P., & Monot, F. (2008).** Biodegradation of monoaromatic and chloroaromatic hydrocarbons. *Petroleum Microbiology: concepts, Environmental Implications, Industrial Applications*, 1, 240-339.
- Van-Veen, S. Q., Claas, E. C. J., & Kuijper, E. J. (2010).** High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 900-907.
- Varjani, S., & Upasani, V. N. (2021).** Bioaugmentation of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514—A novel oily waste degrader for treatment of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 319, 124240.
- Vijayakumar, S., & Saravanan, V. (2015).** In vitro cytotoxicity and antimicrobial activity of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain PB3A. *Asian Journal of Scientific Research*, 8(4), 510.
- Walter, V., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2010).** Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Biosurfactants*, 1-13.
- Wang, Q., Fang, X., Bai, B., Liang, X., Shuler, P. J., Goddard III, W. A., & Tang, Y. (2007).** Engineering bacteria for production of rhamnolipid as an agent for enhanced oil recovery. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 842-853.
- Xu, G., Chen, Y., Eksteen, J., & Xu, J. (2018).** Surfactant-aided coal dust suppression: A review of evaluation methods and influencing factors. *Science of the Total Environment*, 639, 1060-1076.
- Yalaoui-Guellal, D., Brahmi, F., Touati, A., De Champs, C., Banat, I. M., & Madani, K. (2018).** Production of Biosurfactants by Hydrocarbons degrading bacteria isolated from Soummam watershed Sediments of Bejaia in Algeria. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37(1), 189-195.

- Yalaoui-Guellal, D., Fella-Temzi, S., Djafri-Dib, S., Brahmi, F., Banat, I. M., & Madani, K. (2020).** Biodegradation potential of crude petroleum by hydrocarbonoclastic bacteria isolated from Soummam wadi sediment and chemical-biological proprieties of their biosurfactants. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 184, 106554.
- Yalaoui-Guellal, D., Fella-Temzi, S., Djafri-Dib, S., Sahu, S. K., Irorere, V. U., Banat, I. M., & Madani, K. (2021).** The petroleum-degrading bacteria *Alcaligenes aquatilis* strain YGD 2906 as a potential source of lipopeptide biosurfactant. *Fuel*, 285, 119112.
- Yalçın, H. T., Ergin-Tepebaşı, G., & Uyar, E. (2018).** Isolation and molecular characterization of biosurfactant producing yeasts from the soil samples contaminated with petroleum derivatives. *Journal of Basic Microbiology*, 58(9), 782-792.
- Yıldırım, A., Mavi, A., & Kara, A. A. (2001).** Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 4083-4089.
- Yonebayashi, H., Yoshida, S., Ono, K., & Enomoto, H. (2000).** Screening of microorganisms for microbial enhanced oil recovery processes. *Journal of The Japan Petroleum Institute*, 43(1), 59-69.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004).** Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3), 339-347.
- Zeineldin, M., Esmael, A., Al-Hindi, R. R., Alharbi, M. G., Ashenafi Bekele, D., & Teklemariam, A. D. (2023).** Beyond the risk of biofilms: An up-and-coming battleground of bacterial life and potential antibiofilm agents. *Life*, 13(2), 503.
- Zhi, H., Qi, J., Qian, T., & Wei, L. (2019).** Antifungal effects of biosurfactants produced by *Bacillus Subtilis*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(18), 3379.

# *Annexes*

**Annexe 1 : Réactifs et Milieux de cultures****➤ Milieu Salé Minéral (MSM)**

NaCl.....30 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 2,0 g  
 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.....1,0 g  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 3,0 g  
 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O .....0,7g  
 Solution de traces d'éléments...1,0 mL  
 H<sub>2</sub>O distillée qsp.....1000mL  
 pH:7,2±0,2

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

ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O..... 10 mg  
 CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O.....0,50 mg  
 MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O..... 0,50 mg  
 CaCl<sub>2</sub>.....20 mg  
 FeCl<sub>3</sub>..... 30 mg

**➤ Réactif de l'anthrone**

Anthrone..... 0,125 mg  
 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.....63 mg  
 Eau distillée .....25 mL

**➤ Réactif de ninhydrine**

Ninhydrine.....0,35g  
 Acétone.....100 mg

**➤ Réactif de Bradford**

Bleu de Coomacie G250.....100 mg  
 Acide phosphorique 85%.....100 mL  
 Méthanol.....100 mL  
 Eau distillée .....800 mL

**➤ Gélose Muller Hinton**

Infusion debœuf.....300 g/l.  
 Hydrolysate acide de caséine.....17,5 g/l.  
 Amidon.....1,5 g/l.  
 Agar.....17 g/l.  
 pH final (à 25 °C)..... 7,4±0,1

**Mode d'emploi :**

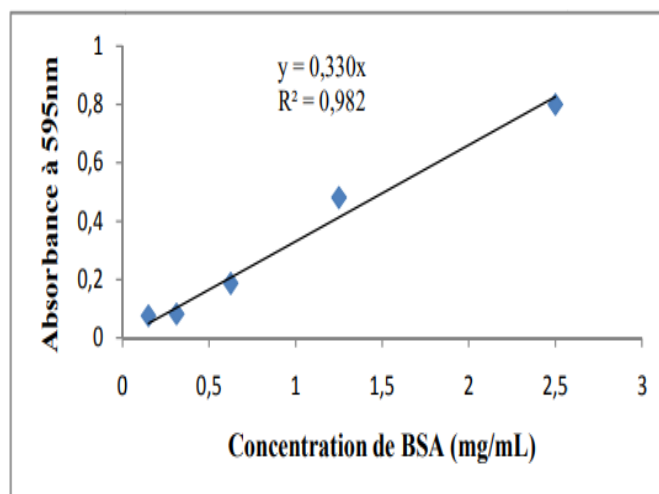
Dissoudre 38 g dans 1000 mL d'eau distillée puis faire bouillir pour dissoudre complètement le milieu. Stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Bien mélanger avant de verser.

**➤ Potato Dextrose Agar****Ingrédients : g/L.**

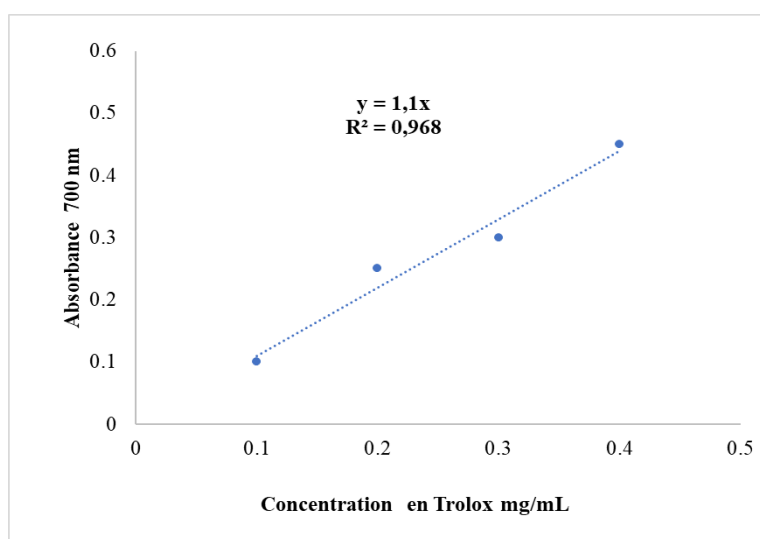
Infusion de de pomme de terre.....200  
 Dextrose.....17,5  
 Agar.....17  
 pH final (à 25°C)..... 5,6 ± 0,2

**Mode d'emploi :**

Dissoudre 42 g dans 1000 mL d'eau distillée puis faire bouillir pour dissoudre complètement le milieu. Stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Bien mélanger avant de verser.

**Annexe 2 : Courbes d'étalonnage**

**Figure 1 :** Courbe d'étalonnage de la BSA pour le dosage des protéines par la méthode Bradford



**Figure 2 :** Courbe d'étalonnage de Trolox pour le dosage du pouvoir réducteur

**Annexe 3** Groupes fonctionnels en FTIR.**Tableau I** : Groupes fonctionnels et bandes caractéristiques en FTIR

| Groupe fonctionnel                                        | Type de vibration             | Plage de vibration (cm <sup>-1</sup> ) | Commentaires                                             |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>O-H (alcool, phénol)</b>                               | Élongation (stretching)       | 3200 – 3600                            | Bande large, souvent intense                             |
| <b>N-H (amines, amides)</b>                               | Élongation                    | 3300 – 3500                            | Bande moyenne à faible, parfois doublet                  |
| <b>C-H (alcane)</b>                                       | Élongation (sp <sup>3</sup> ) | 2850 – 2960                            | Bandes multiples selon CH <sub>3</sub> / CH <sub>2</sub> |
| <b>C-H (alcènes, aromatiques)</b>                         | Élongation (sp <sup>2</sup> ) | 3000 – 3100                            | Moins intense que sp <sup>3</sup>                        |
| <b>C≡C / C≡N</b>                                          | Élongation (triple liaison)   | 2100 – 2260                            | Bande faible à moyenne                                   |
| <b>C=O (carbonyles : acides, cétones, esters, amides)</b> | Élongation                    | 1650 – 1750                            | Bande forte, position dépend du type                     |
| <b>C=C (alcènes, aromatiques)</b>                         | Élongation                    | 1600 – 1680                            | Bande moyenne                                            |
| <b>C–O (alcools, esters, acides)</b>                      | Élongation                    | 1000 – 1300                            | Bande variable, souvent doublet                          |
| <b>NO<sub>2</sub> (groupement nitro)</b>                  | Asymétrique et symétrique     | ~1515 (asym) / ~1350 (sym)             | Deux bandes distinctes                                   |
| <b>S=O (sulfates, sulfonates)</b>                         | Élongation                    | 1000 – 1350                            | Bande forte et nette                                     |

*Productions  
scientifiques*

## Productions scientifiques

### Publications scientifiques

| N° | Auteurs                                                                                                                                    | Titre                                                                                                                                                                       | Journal                                      | Catégorie                                 |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 01 | <b>Salim Djafri-Dib</b> , Drifa Yalaoui-Guellal, Nadia Amessis-Ouchemoukh, Khodir Madani, Salim Ouchemoukh.                                | Optimization of Lipopeptide Biosurfactant Production with Anti-Inflammatory and Antimicrobial Activities                                                                    | Current of Bioactive Compounds               | B (2025)                                  |
| 02 | <b>Salim Djafri-Dib</b> , Drifa Yalaoui-Guellal, Nadia Amessis-Ouchemoukh, Khodir Madani, Salim Ouchemoukh.                                | Biological Activities, Biosorption of Heavy Metals, and Stability of Lipopeptide Biosurfactant Produced by the <i>Alcaligenes aquatilis</i> Bacterium YGD-2906              | Current of Bioactive Compounds               | B (2025)<br>(Accepté pas encore en ligne) |
| 03 | Drifa Yalaoui-Guellal, Samira Fella-Temzi, <b>Salima Djafri-Dib</b> , Sunil Kumar Sahu, Victor U. Irorere, Ibrahim M. Banat, Khodir Madani | The petroleum-degrading bacteria <i>Alcaligenes aquatilis</i> strain YGD 2906 as a potential source of lipopeptide biosurfactant                                            | Fuel                                         | A <sup>+</sup> (2021)                     |
| 04 | Drifa Yalaoui-Guellal, Samira Fella-Temzi, <b>Salima Djafri-Dib</b> , Fatiha Brahmi, Ibrahim M. Banat, Khodir Madani                       | Biodegradation potential of crude petroleum by hydrocarbonoclastic bacteria isolated from Soummam wadi sediment and chemical-biological proprieties of their biosurfactants | Journal of Petroleum Science and Engineering | B (2020)                                  |

## Communications



### Communications Internationales

| N° | Nom et Prénom                                                                                                       | Intitulée de la communication                                                                                                                   | Intitulé, date et lieu de la manifestation                                                                                                                                                                                                                                |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 01 | <b>Salima Djafri-Dib,</b><br>Drifa Yalaoui-Guellal,<br>Salim Ouchemoukh                                             | Application of biosurfactant for removal of heavy metal from waste water                                                                        | International Conference on Innovative Applied Energy (Smart Exhibition) (DZENERGY 2021), will be held from 26 To 27 March 2021, Hassi Messaoud, Ouargla. Algeria                                                                                                         |
| 02 | <b>Salima Djafri-Dib,</b><br>Drifa Yalaoui-Guellal,<br>Khodir Madani<br>Salim Ouchemoukh                            | Etude de production et de stabilité de biosurfactant lipopeptidique isolé par la bactérie <i>Alcaligenes aquatilis</i>                          | Séminaire International Bioressources et Développement Durable (BDD 2023). 3 et 4 mai au Centre National des Sports et Loisirs de Tikjda (CNSLT), à Bouira                                                                                                                |
| 03 | <b>Salima Djafri-Dib,</b><br>Drifa Yalaoui-Guellal,<br>Khodir Madani<br>Salim Ouchemoukh                            | Activité antioxydante du biosurfactant BLA 2906 produit par <i>Alcaligenes aquatilis</i> YGD-2906                                               | International Seminar on Biodiversity, Valorization and Conservation of Urban and Forest Ecosystems: (In support of sustainable development) 28.29-.04.2021 Université Mohamed Boudiaf de M'sila Faculté des Sciences Département des Sciences de la Nature et de la Vie. |
| 04 | Drifa Yalaoui-Guellal, <b>Salima Djafri-Dib</b> ,<br>Victor U. Irorered,<br>Ibrahim M. Banatd and<br>Khodir Madanie | Chemical profile determination of lipopeptide biosurfactant produced by <i>Alcaligenes aquatilis</i> strain YGD 2906 using MALDI-TOF-MS method. | International Conference on Innovative Applied Energy Smart Exhibition) DZENERGY 27, 2021, Hotel Zaid Hassi Messaoud, Ouargla, Algeria                                                                                                                                    |
| 05 | Drifa Yalaoui-Guellal, Samira Fella-Temzi,<br><b>Salima Djafri-Dib</b> , Sunil Kumar Sahu and<br>Khodir Madani      | Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading <i>Alcaligenes aquatilis</i> strain YGD 2906                    | Conference: International Seminar on Biodiversity, Valorization and Conservation of Urban and Forest Ecosystems 28.29-.04.2021 (In support of sustainable development), At: Mohamed Boudiaf University of M'sila, Algeria.                                                |



**Communication Nationale**

| <b>N°</b> | <b>Nom et Prénom</b>                                                                                                           | <b>Intitulée de la communication</b>                                         | <b>Intitulé, date et lieu de la manifestation</b>                                                                                                 |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 01        | <b>Salim Djafri-Dib</b> , Drifa<br>Yalaoui-Guellal,<br>Nadia Amessis-<br>Ouchemoukh,<br>Khodir Madani,<br>Salim<br>Ouchemoukh. | Application des biosurfactants<br>microbiens dans les différents<br>domaines | 6 <sup>èmes</sup> Journées des Sciences de la<br>Nature et de la Vie les 28, 29 et 30<br>novembre 2023. Université<br>Abderrahmane Mira – Bejaia. |

## Résumé :

Ce travail a pour but d'étudier l'extraction de biosurfactant BLA 2906 produit par la souche *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906, de mesurer par les différentes méthodes la capacité de production de biosurfactant, de déterminer ses profils chimique, biochimique et biologique et d'optimiser sa production. Ce biosurfactant est actif ( $E_{24}$  : 63,11 %, étalement d'huile : 23,66 mm, effondrement de la goutte : positif) malgré un test hémolytique négatif. Des analyses spectroscopiques (UV, FTIR) et chromatographiques (CCM) ont confirmé sa nature lipopeptidique. Il présente une bonne stabilité face aux variations de température, pH et salinité, et une forte activité émulsifiante atteignant 68,37 % dans des conditions optimisées. Sur le plan biologique, BLA 2906 possède des activités antifongiques, antibactérienne et anti-inflammatoire. En outre, il a un pouvoir antioxydant (ABTS, DPPH, phosphomolybdate) et une capacité à chélater les métaux lourds (Cu, Fe, Pb, Cd, Zn). Les analyses par MALDI-TOF/MS et HPLC/MS/MS ont identifié des surfactines et fengycines parmi les lipopeptides produits. Le plan d'expérience a permis d'optimiser sa production. Ces résultats soulignent le potentiel multifonctionnel du BLA 2906 pour des applications biotechnologiques, environnementales et thérapeutiques.

**Mots clés :** *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906, Biosurfactant,  $E_{24}$  %, Stabilité, Activités biologiques, MALDI-TOF/MS, HPLC/MS/MS, Plackett-Burman, RSM et CCD.

## Abstract:

This study focuses on the extraction of the BLA 2906 biosurfactant produced by *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906, evaluating its production capacity using various methods, and determining its chemical, biochemical, and biological profiles, as well as optimizing its production. BLA 2906 is an active biosurfactant ( $E_{24}$ : 63.11%, oil spreading: 23.66 mm, drop collapse: positive) with a negative hemolytic test. Spectroscopic (UV, FTIR) and chromatographic (TLC) analyses confirmed its lipopeptide nature. It exhibits high stability under varying temperature, pH, and salinity conditions, and reaches an emulsifying activity of 68.37% under optimized conditions. Biologically, BLA 2906 shows antifungal, antibacterial, and anti-inflammatory activities. It also demonstrates antioxidant potential (ABTS, DPPH, phosphomolybdate assays) and heavy metal chelation ability (Cu, Fe, Pb, Cd, Zn). MALDI-TOF/MS and HPLC/MS/MS analyses identified surfactins and fengycins among the produced lipopeptides. Experimental design (Plackett–Burman, RSM, CCD) allowed for optimization of its production. These findings highlight the multifunctional potential of BLA 2906 for biotechnological, environmental, and therapeutic applications.

**Keywords:** *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906, biosurfactant,  $E_{24}$  %, stability, biological activities, MALDI-TOF/MS, HPLC/MS/MS, Plackett–Burman, RSM, CCD.

## المخلص:

تهدف هذه الدراسة إلى استخلاص المادة الخافضة للتوتر السطحي BLA 2906 المنتجة من طرف السلالة *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906، وتقييم قدرتها على الإنتاج باستخدام طرق مختلفة، وتحديد خصائصها الكيميائية والبيوكيميائية والبيولوجية، بالإضافة إلى تحسين إنتاجها. أظهر هذا البيوسورفاكتانت نشاطاً ملحوظاً ( $E_{24}$  = 63.11 %، انتشار الزيت: 23.66 مم، اختبار انهيار القطرة: إيجابي) رغم أن اختبار التحلل الدموي كان سلبياً. أكدت التحاليل الطيفية (FTIR، UV) والكروماتوغرافية (CCM) طبيعته الليبوبيبتيدية. يتميز بثبات جيد تجاه تغيرات الحرارة، والـ pH، والملوحة، ويصل نشاطه الاستحلابي إلى 68.37 % تحت ظروف مثلى. من الناحية البيولوجية، أظهر BLA 2906 أنشطة مضادة للفطريات، والبكتيريا، والالتهابات، بالإضافة إلى قدرة مضادة للأوكسدة (ABTS، DPPH، فوسفو موليبديات) وقدرة على معقدة المعادن الثقيلة (Cu، Fe، Pb، Cd، Zn). كشفت تحاليل MALDI-TOF/MS و HPLC/MS/MS عن وجود السيرفاكتينات والفينغيسينات بين الليبوبيبتيدات المنتجة سمح التصميم التجريبي (Plackett–Burman، RSM، CCD) بتحسين عملية الإنتاج. تؤكد هذه النتائج الإمكانيات المتعددة لاستخدام BLA 2906 في التطبيقات البيوتكنولوجية والبيئية والعلاجية.

**الكلمات المفتاحية:** *Alcaligenes aquatilis* YGD 2906، بيوسورفاكتانت،  $E_{24}$  %، الثبات، الأنشطة البيولوجية، MALDI-TOF/MS، HPLC/MS/MS، Plackett–Burman، RSM، CCD.