

Centre Eau Terre Environnement

**Stratégies de fermentation microbienne pour la production de biosurfactants
à faible coût à partir de milieux résiduels fermentescibles**

Par

Fatou Danielle Niang

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M. Sc.)

en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Amadou Diop
INRS

Examineur externe

Amine Mahmoudi
Agropur

Directeur de recherche

Kokou Adjallé
INRS, ETE

Codirecteur de recherche

Jean-François Blais
INRS, ETE

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'accord à exprimer ma profonde gratitude à mon directeur de recherche Kokou Adjallé qui m'a accueillie dans son équipe. Merci pour la formation, l'encadrement et votre bienveillance durant toutes ces années de formation à l'INRS au centre ETE.

Je remercie également mon codirecteur de recherche Jean-François Blais pour sa disponibilité et ses connaissances partagées pour la bonne marche du projet de recherche.

Mention spéciale à l'associé de recherche Adama Ndao qui a beaucoup contribué à la mise en place de mes travaux de recherche, à mon auto-formation et qui n'a cessé d'être de bons conseils de mes débuts à la finalisation de ce mémoire.

Mes remerciements vont également à l'endroit de tous les étudiants de l'équipe de recherche que j'ai trouvés sur place et avec qui j'ai pu travailler durant ma formation : Ghita Bennani, Delon Konan, Daphné Brodeur et Linh Nguyen.

RÉSUMÉ

Les produits de nettoyage et d'assainissement sont essentiels tant dans les ménages pour des utilisations domestiques que dans l'industrie. Ils jouent un rôle crucial dans la maintenance de l'hygiène et de la propreté, contribuant ainsi à la santé publique et à l'efficacité des procédés industriels. Cependant, la production de ces produits pose des problèmes environnementaux significatifs, principalement en raison de l'utilisation de dérivés pétrochimiques, de leur toxicité et de leur faible biodégradabilité.

Dans le cadre du développement durable, il est impératif d'adopter des voies biologiques pour la production d'enzymes et de surfactants, afin de remplacer les produits obtenus par la chimie et les dérivés du pétrole. Toutefois, ce qui freine l'adoption généralisée des produits de nettoyage biologiques est le coût élevé des agents actifs obtenus par voie biologique. En effet, les surfactants microbiens sont souvent non compétitifs par rapport à leurs homologues chimiques, principalement en raison des coûts élevés de production liés aux substrats semi-synthétiques, qui représentent plus de 50% du coût total de production.

L'objectif de ce travail est d'étudier et d'optimiser deux facteurs majeurs influençant la performance technique et économique des produits nettoyants biologiques : le choix du substrat de fermentation et la sélection des microorganismes. Cette étude s'est basée principalement sur deux stratégies. La première consistait à utiliser des milieux résiduels fermentescibles capables d'induire la production d'enzymes telles que l'amylase, la protéase et la lipase. Ce choix permettrait de réduire le coût du procédé en utilisant des substrats à coût nul ou à très faible coût (transport des résidus). La seconde stratégie visait à étudier et à optimiser la capacité de production d'enzymes et de surfactants de plusieurs microorganismes à partir de ces milieux résiduels fermentescibles.

Les essais de fermentation en fioles agitées ont permis de sélectionner le milieu boues secondaires Kruger pour la culture de *Bacillus licheniformis* et le milieu SIW pour la culture de *Bacillus subtilis* et *Starmerella bombicola* et de fixer les valeurs optimales des paramètres opératoires pour les bioréacteurs (solide total du milieu résiduel de fermentation, % d'inoculum (v/v) et température d'incubation du microorganisme). Les travaux de mise à l'échelle en bioréacteur de 5 L ont permis, avec le suivi et le contrôle des paramètres du bioréacteur, d'améliorer les résultats des indicateurs de la production de biosurfactants par *Bacillus subtilis* (extrait de 1,26 g/L de bouillon de fermentation, tension de surface de 59,74 dyn/cm et émulsification à 54%) et de *Starmerella bombicola* (extrait de 1,10 g/L de bouillon de fermentation, tension de surface de 55,56 dyn/cm et émulsification à 45%). Alors que les résultats obtenus pour *Bacillus licheniformis* étaient moins concluants en bioréacteurs (extrait de 0,58 g/L de bouillon de fermentation, tension de surface de 69,0 dyn/cm et émulsification à 72% - le milieu Kruger de base donne une émulsion à 75% avant toute fermentation).

Mots-clés : Biosurfactants, enzymes, microorganismes, résidus fermentescibles, nettoyeurs biologiques.

ABSTRACT

Cleaning and sanitation products are essential both in households for domestic and industrial applications. They play a crucial role in maintaining hygiene and cleanliness, thereby contributing to public health and the efficiency of industrial processes. However, the production of these products poses significant environmental problems, mainly due to the use of petrochemical derivatives, their toxicity, and their low biodegradability.

In the context of sustainable development, it is imperative to adopt biological pathways to produce enzymes and surfactants to replace products obtained through chemistry and petroleum derivatives. However, what hinders the widespread adoption of biological cleaning products is the high cost of active agents obtained biologically. Indeed, microbial surfactants are often non-competitive compared to their chemical counterparts, mainly due to the high production costs associated with semisynthetic substrates, which represent more than 50% of the total production cost.

The main objective of this work is to study and optimize two major factors influencing the technical and economic performance of biological cleaning products: the choice of fermentation substrate and the selection of microorganisms. This study is primarily based on two strategies. The first consists of using fermentable residual media capable of inducing the production of enzymes such as amylase, proteases, and lipase. This choice would reduce the cost of the process by using substrates at zero or very low cost (residue transportation). The second strategy aims to study and optimize the enzyme and surfactant production capacity of several microorganisms using these fermentable residual media.

Fermentation essays in in agitated flasks enabled to select the Kruger secondary sludge medium for *Bacillus licheniformis* culture and the SIW medium for *Bacillus subtilis* and *Starmerella bombicola* culture, and to set the optimum values for the bioreactor operating parameters (total solids of the residual fermentation medium, % inoculum (v/v) and strain incubation temperature). By monitoring and controlling bioreactor parameters, scale-up work in a 5 L bioreactor improved the results for biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* (extract of 1.26 g/L fermentation broth, surface tension of 59.74 dyn/cm and 54% emulsification) and *Starmerella bombicola* (extract of 1.10 g/L fermentation broth, surface tension of 55.56 dyn/cm and 45% emulsification). The results obtained for *Bacillus licheniformis* were less conclusive in bioreactors (extract of 0.58 g/L fermentation broth, surface tension of 69.0 dyn/cm and 72% emulsification – Kruger base medium produces a 75% emulsion before any fermentation).

Keywords: Biosurfactants, enzymes, microorganisms, fermentable residues, biological cleaners.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES FIGURES	xiii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES ÉQUATIONS	xix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxi
1 INTRODUCTION	1
2 REVUE DE LITTÉRATURE	3
2.1 Surfactants ou tensioactifs	3
2.1.1 Généralités	3
2.1.2 Voies de synthèse possible des tensioactifs	4
2.1.3 Structures chimiques et classification des tensioactifs.....	4
2.1.4 Mode d'action des tensioactifs en détergence	5
2.1.5 Synergie d'actions enzymes – tensioactifs	7
2.2 Biosurfactants : surfactants d'origine microbienne	7
2.2.1 Microorganismes producteurs et types de BS	8
2.2.2 Facteurs influençant la production de BS	13
2.2.3 Méthodes d'évaluation de la production de BS	15
3 CONTEXTE ET OBJECTIFS D'ÉTUDE	19
4 MATÉRIELS ET MÉTHODES	21
4.1 Matières premières : souches microbiennes - boues et eaux usées d'industries	21

4.1.1	OS1 : Sélection des souches microbiennes	21
4.1.2	OS2 : Sélection MRF disponibles dans la province de Québec.....	22
4.2	Approches expérimentales.....	26
4.3	Méthodologies de fermentation.....	27
4.3.1	OS3 : Stratégies de fermentation microbienne en erlenmeyers sur MSS.....	27
4.3.2	OS3 : Stratégies de fermentations microbiennes en erlenmeyers sur MRF	31
4.3.3	OS4 : Optimisation des fermentations en erlenmeyers.....	34
4.3.4	OS5 : Fermentations en bioréacteurs de 5 litres.....	38
4.3.5	OS6 : Caractérisation des BS (confère Annexe 8.8).....	41
5	RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	43
5.1	Sélection des MRF	43
5.2	Stratégies de fermentation microbienne en fioles agitées avec MRF.....	45
5.2.1	Starmerella bombicola ATCC 22214.....	45
5.2.2	Bacillus subtilis ATCC 6633	49
5.3	Optimisation des fermentations microbiennes en fioles agitées	52
5.3.1	Starmerella bombicola ATCC 22214.....	52
5.3.2	Bacillus subtilis ATCC 6633	55
5.3.3	Bacillus licheniformis ATCC 14580.....	58
5.4	Fermentations en bioréacteurs de 5 L	61
5.4.1	Starmerella bombicola ATCC 22214/SIW	61
5.4.2	Bacillus subtilis ATCC 6633/SIW	67
5.4.3	Bacillus licheniformis ATCC 14580/Kruger.....	72
6	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	77
7	BIBLIOGRAPHIE.....	79
8	ANNEXES	85
8.1	Composition des milieux semi-synthétiques.....	85

8.2	Choix et composition des milieux résiduaire	86
8.3	Revitalisation et stockage des microorganismes	87
8.3.1	Revitalisation.....	87
8.3.2	Conservation au glycérol.....	87
8.4	Fermentations de <i>Bacillus licheniformis</i> et <i>Starmerella bombicola</i> sur MSS.....	89
8.5	Fermentations en erlenmeyers avec milieux SIW, Kruger, BFW et BDS.....	90
8.5.1	<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214.....	90
8.5.2	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	92
8.5.3	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580.....	94
8.6	Fermentation en bioréacteur de 150 L par <i>Starmerella bombicola</i>.....	96
8.7	Concentration des surnageants avec membranes 1K et 2K	97
8.8	Caractérisation moléculaire des BS.....	98
8.9	Indices d'émulsification de quelques surfactants classiques	99
8.10	Analyses CHNS.....	100

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Types de tensioactifs en fonction de la charge portée par la partie hydrophile (Redon, 2019)	5
Figure 2.2	Mécanisme de la formation de micelles dans une émulsion huile-eau (Mohd-Setapar et al., 2022)	6
Figure 2.3	Structure de la surfactine lipopeptide cyclique (a) de <i>Bacillus sp.</i> (Smyth et al. 2010).....	9
Figure 2.4	Surfactine (A) – Lichénysine (B) (Gudiña et Teixeira, 2022)	9
Figure 2.5	Développement des plantes grâce aux lipopeptides de <i>Pseudomonas sp.</i> (Chauhan et al., 2023)	10
Figure 2.6	Modèle schématique de la production de BS – paramètres et conditions opératoires (Dias et Nitschke, 2023).....	13
Figure 4.1	<i>Bacillus subtilis</i> (a) - <i>Bacillus licheniformis</i> (b) – <i>Starmerella bombicola</i> (c).....	22
Figure 4.2	Milieus résiduels fermentescibles	23
Figure 4.3	Dispositif d’analyse de la TS par la méthode de la goutte pendante	30
Figure 4.4	Étapes d’extraction des composés du bouillon de fermentation.....	31
Figure 4.5	Exemple de fermentation en erlenmeyers avec <i>Bacillus subtilis</i>	34
Figure 4.6	Fermentation en bioréacteurs : souche – MRF et paramètres.....	38
Figure 4.7	Fermentation en bioréacteurs : souche – MRF et paramètres.....	39
Figure 4.8	Fermentation en bioréacteurs de 5 L – Analyses physico-chimiques	40
Figure 5.1	Courbes de croissance et de pH de la levure <i>Starmerella bombicola</i> avec SIW, Kruger, BFW et BDS. Traits pleins : courbes de croissance; Traits en pointillés : courbes de variation de pH.....	47
Figure 5.2	Courbes de croissance de <i>Bacillus subtilis</i> avec les milieux SIW, Kruger, BDS et BFW...	51
Figure 5.3	Concentrations (g/L) des BS pour le plan d’expérience de <i>Starmerella bombicola</i> - SIW..	54
Figure 5.4	Concentrations (g/L) des BS pour le plan d’expérience de <i>Bacillus subtilis</i> - SIW	57
Figure 5.5	Concentration (g/L) des BS pour le plan d’expérience de <i>Bacillus licheniformis</i> - Kruger	60
Figure 5.6	Courbes de croissance en bioréacteur de 5 L pour <i>Starmerella bombicola</i>	65

Figure 5.7	Courbes de croissance en bioréacteur de 5 L pour <i>Bacillus subtilis</i>	70
Figure 5.8	Courbes de croissance en bioréacteur de 5 L pour <i>Bacillus licheniformis</i>	74
Figure 8.1	Courbes de croissance de <i>Starmerella bombicola</i> avec SIW et Kruger 2 et 5%	91
Figure 8.2	Courbes de croissance cellulaire de <i>Bacillus Subtilis</i> avec un inoculum de 2 et 5% (v/v)..	93
Figure 8.3	Courbes de croissance cellulaire de <i>Bacillus licheniformis</i> avec un inoculum de 5% (v/v)	95
Figure 8.4	Membrane de concentration par ultrafiltration 1K et 2K	97
Figure 8.5	Préparation de vials en bioréacteurs de 5 L pour l'injection au GC-MS.....	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2-1	Quelques exemples de biosurfactants et microorganismes producteurs (adapté de Makkar et al., 2011)	12
Tableau 4-1	Souches microbiennes, BS recherchés et propriétés tensioactives	22
Tableau 4-2	MRF sélectionnés, désignations et provenance	23
Tableau 4-3	Fermentations en erlenmeyers sur MSS des souches microbiennes sélectionnées	27
Tableau 4-4	Tableau récapitulatif des différentes fermentations en erlenmeyers effectuées sur MRF et les analyses	33
Tableau 4-5	Plan d'expérience de la fermentation de <i>Starmerella bombicola</i> avec le milieu de culture SIW	35
Tableau 4-6	Plan d'expérience de la fermentation de <i>Bacillus subtilis</i> avec le milieu de culture SIW ..	36
Tableau 4-7	Plan d'expérience de la fermentation de <i>Bacillus licheniformis</i> avec le milieu de culture SIW	37
Tableau 4-8	Conditions de fermentations en bioréacteurs de 5 L	41
Tableau 5-1	Analyses physico-chimiques des MRF	44
Tableau 5-2	Profil de croissance cellulaire de <i>Starmerella bombicola</i> en fioles agitées.....	46
Tableau 5-3	Mesures de TS pour <i>Starmerella bombicola</i> en fioles agitées.....	48
Tableau 5-4	Concentration en extraits de BS pour <i>Starmerella bombicola</i> en erlenmeyers	48
Tableau 5-5	Profil de croissance cellulaire de <i>Bacillus subtilis</i> en fioles agitées.....	50
Tableau 5-6	Concentration en extraits de BS pour <i>Bacillus subtilis</i> en erlenmeyers	52
Tableau 5-7	Concentrations de BS (g/L) mesurées sous différentes conditions de fermentation de <i>Starmerella bombicola</i>	53
Tableau 5-8	Indices d'émulsification IE ₂₄ mesurés sous différentes conditions de fermentation par <i>Starmerella bombicola</i>	55
Tableau 5-9	Concentrations en extraits de BS (g/L) mesurées sous différentes conditions de fermentation par <i>Bacillus subtilis</i>	56

Tableau 5-10	Indices d'émulsification IE ₂₄ mesurés sous différentes conditions de fermentation par <i>Bacillus subtilis</i>	58
Tableau 5-11	Concentrations en extraits de BS (g/L) mesurées sous différentes conditions de fermentation par <i>Bacillus licheniformis</i>	59
Tableau 5-12	Indice d'émulsification IE ₂₄ mesurés sous différentes conditions de fermentation par <i>Bacillus licheniformis</i>	61
Tableau 5-13	Essai BR1 de fermentation de 5 L de <i>Starmerella bombicola</i>	63
Tableau 5-14	Essai BR2 de fermentation de 5 L de <i>Starmerella bombicola</i>	64
Tableau 5-15	Précipitation de composés extracellulaires pour <i>Starmerella bombicola</i> en BR1 et BR2	65
Tableau 5-16	TS sur surnageant brut de <i>Starmerella bombicola</i> en bioréacteur de 5 L	66
Tableau 5-17	TS sur surnageant concentré 1K de <i>Starmerella bombicola</i> en bioréacteur de 5 L	66
Tableau 5-18	TS sur surnageant concentré 2K de <i>Starmerella bombicola</i> en bioréacteur de 5L	66
Tableau 5-19	Mesure des IE ₂₄ pour <i>Starmerella bombicola</i> en BR1 et BR2	67
Tableau 5-20	Essai BR1 de fermentation de 5 L de de <i>Bacillus subtilis</i>	69
Tableau 5-21	Essai BR2 de fermentation de 5 L de <i>Bacillus subtilis</i>	69
Tableau 5-22	Précipitation de composés extracellulaires pour <i>Bacillus subtilis</i> en BR1 et BR2	70
Tableau 5-23	TS sur surnageant brut de <i>Bacillus subtilis</i> en bioréacteur de 5 L	71
Tableau 5-24	TS sur surnageant concentré 2K de <i>Bacillus subtilis</i> en bioréacteur de 5 L	71
Tableau 5-25	Mesure des IE ₂₄ pour <i>Bacillus subtilis</i> en BR1 et BR2	72
Tableau 5-26	Essai BR1 de fermentation de 5 L de <i>Bacillus licheniformis</i>	73
Tableau 5-27	Essai BR2 de fermentation de 5 L de <i>Bacillus licheniformis</i>	74
Tableau 5-28	Précipitation de composés extracellulaires pour <i>Bacillus licheniformis</i> en BR1 et BR2	75
Tableau 5-29	TS sur surnageant brut de <i>Bacillus licheniformis</i> en bioréacteur de 5 L	75
Tableau 5-30	Mesure des IE ₂₄ pour <i>Bacillus licheniformis</i> en BR1 et BR2	76
Tableau 8-1	Souches sélectionnées – numéro ATCC et composition de leur MSS de croissance	85
Tableau 8-2	Première réception de MRF pour les travaux de production de BS	86

Tableau 8-3	Croissance cellulaire et extractions sur MSS.....	89
Tableau 8-4	Fermentations en erlenmeyers de <i>Starmerella bombicola</i> avec un inoculum de 2 et 5% ...	90
Tableau 8-5	Mesures de TS du surnageant pour <i>Starmerella bombicola</i>	91
Tableau 8-6	Extraction par HCl de <i>Starmerella bombicola</i>	91
Tableau 8-7	Fermentations en erlenmeyers de <i>Bacillus subtilis</i> avec un inoculum de 2 et 5%	92
Tableau 8-8	Données de fermentations en erlenmeyers et suivi pH de <i>Bacillus licheniformis</i>	94
Tableau 8-9	Extraction par HCl de <i>Bacillus licheniformis</i>	95
Tableau 8-10	Paramètres opératoires en bioréacteur de 150 L lors de la fermentation avec <i>Starmerella bombicola</i>	96
Tableau 8-11	Comparaison des résultats obtenus en bioréacteurs de 5L et 150 L lors de la fermentation avec <i>Starmerella bombicola</i>	96
Tableau 8-12	IE ₂₄ de plusieurs bio surfactants à une fraction massique de 0,1 % dans une solution tampon Tris-HCl de 50 mM (pH=7,5) Gong et al., 2009).....	99
Tableau 8-13	Analyses CHNS des échantillons de SIW et Kruger utilisés en bioréacteurs de 5 L	100

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 4.1	Détermination du solide total (ST)	24
Équation 4.2	Détermination de la matière en suspension (MS).....	24
Équation 4.3	Dénombrement cellulaire en UFC/mL	28
Équation 4.4	Détermination de l'Indice d'Émulsification (IE ₂₄)	29
Équation 4.5	Détermination de la concentration en BS dans le bouillon de fermentation	31

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BDS :	Brewery distillation sludge (boues de brasserie)
BFW :	Brewery fermentation wastewater (eaux usées de brasserie)
BS :	Biosurfactant
DOE:	Design of experiments
E/H :	Émulsion eau dans huile
GL :	Glycolipides
Gln :	Glutamine
Glu :	Glutamate (acide glutamique)
H/E :	Émulsion huile dans eau
HBL:	Hydrophilic/lipophilic balance
HCl:	Acide chlorhydrique
IE ₂₄ :	Indice d'émulsification (lecture après 24 h de repos)
Kruger :	Boues secondaires de pâte et papier de Kruger
LP :	Lipopeptides ou lipoprotéines
MEL :	Mannosylerythritol lipids (lipides de mannosylérythritol)
MRF :	Milieux résiduaux fermentescibles
MSS :	Milieux semi-synthétiques
OS:	Objectif spécifique
PL :	Phospholipides
SIW :	Starch industrial wastewater (eaux usées d'amidon)
TS :	Tension de surface (ou tension superficielle)
UFC :	Unité formatrice de colonie (ou CFU)

1 INTRODUCTION

De nos jours, les produits de nettoyage et d'assainissement jouent un rôle crucial tant dans les ménages que dans l'industrie. Leur capacité à éliminer les poussières, les graisses et les microorganismes est essentielle pour garantir la salubrité des surfaces. La formulation de ces produits inclut divers composants, tels que les tensioactifs ou surfactants, les agents anticalcaires, les agents de blanchiment, les enzymes, les agents alcalins et les parfums (Safer, 2018; Nardello-Rataj et Ho Tan Tai, 2006). Parmi ces composants, les surfactants occupent une place prépondérante, représentant entre 15 et 40% de la composition des produits de nettoyage (Cheng et al., 2020; Yangxin et al., 2008). Ils confèrent aux produits de nettoyage leurs propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes et dispersantes nécessaires à déloger les saletés.

Durant la pandémie de COVID-19, la demande en produits de nettoyage et désinfectants a considérablement augmenté. Cependant, cette demande accrue a mis en lumière la dépendance des entreprises canadiennes vis-à-vis des fournisseurs étrangers. En 2023, les importations dans l'industrie de fabrication de savons et autres produits nettoyants au Canada ont atteint 3,5 milliards de dollars canadiens, contre 1,2 milliard de dollars pour les exportations (CIS, 2023). En outre, les surfactants dérivés du pétrole, majoritairement utilisés, présentent des risques pour la santé humaine et l'environnement, étant difficiles à biodégrader et générant des sous-produits potentiellement dangereux (Johnson et al., 2021).

Dans un contexte de développement durable où le Québec appuie les engagements climatiques et le développement durable, il est crucial de développer des alternatives écologiques aux surfactants pétrochimiques. Les microorganismes offrent une variété prometteuse de molécules biologiques pour des applications industrielles (Varjani et Upasani, 2017). Des études ont montré que par des stratégies de fermentation bien étudiées et optimisées, les microorganismes peuvent produire avec une grande performance les agents actifs des produits nettoyants, tels que les biosurfactants (BS) et les enzymes (George et Jayachandran, 2013; Santos et al., 2016; Kumar et al., 2016; Almeida et al., 2017; Kashif et al., 2022; Pal et al., 2023). Cependant, le coût élevé de production de ces BS, principalement dû aux substrats semi-synthétiques, constitue un des obstacles à leur compétitivité économique (Banat et al., 2014). Pour surmonter ce défi, il est proposé d'utiliser des milieux résiduels fermentescibles riches en carbone, en azote et en phosphore comme substrats de culture. En effet, il existe plusieurs initiatives qui témoignent de la capacité des microorganismes à produire des bioproduits par fermentation des résidus fermentescibles. Kurek et Benbettaieb, 2022 ont montré leur capacité de production de biopolymères et de probiotiques. Cette approche pourrait réduire les coûts de production et offrir une alternative viable aux dérivés chimiques pétroliers.

C'est dans ce contexte qu'intervient ce projet de recherche qui cherche à développer un procédé biologique de production des principaux composants des produits de nettoyage à un faible coût à partir des résidus fermentescibles dans un concept basé sur la bioéconomie et l'économie circulaire. Cela nécessite le développement de nouvelles connaissances sur la sélection des microorganismes spécifiques ayant un potentiel de croissance élevée dans différents milieux résiduels fermentescibles, avec une production d'enzymes et de biosurfactants de concentrations élevées. Cela nécessite aussi des connaissances approfondies des propriétés physico-chimiques et biologiques des différents ingrédients, en vue de la formulation des produits de nettoyage. Ce projet, qui se fait en partenariat avec la compagnie Sani Marc, va permettre à cette entreprise pancanadienne de distribution de produits de nettoyage d'assurer son autonomie vis-à-vis de ses fournisseurs étrangers, tout en cherchant à se positionner comme un leader sur le marché mondial de produits de nettoyage biologiques et écologiques. Ainsi, pour ce qui concerne cette partie du projet, les objectifs spécifiques sont :

1. Une revue de littérature à jour pour la sélection de microorganismes et la production de surfactants à partir de milieux résiduels fermentescibles pour la production de produits de nettoyage de surface;
2. La mise au point de stratégies de fermentation en fioles agitées à partir de différents milieux résiduels fermentescibles;
3. L'optimisation des conditions de culture en bioréacteurs de 5 L;
4. La mise à l'échelle des conditions de culture en bioréacteur de 150 L.

Ces objectifs contribueront à produire des BS écologiques et compétitifs, pour une industrie de produits de nettoyage respectueuse de l'environnement.

2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Surfactants ou tensioactifs

2.1.1 Généralités

Mot anglais composé de Surface – Active – Agent, les surfactants (surfactifs ou tensioactifs) sont, par définition, des molécules d'agents de surface qui, même à faible quantité, présentent la propriété d'abaisser l'énergie de surface entre deux phases, par exemple, l'interface air/eau ou eau/huile (Rieger, 2020). Cette propriété peut favoriser ou faciliter l'émulsion de liquides organiques tels que l'huile avec l'eau.

Les surfactants sont des composés amphiphiles, présentant à la fois des fractions hydrophiles polaires (miscibles dans l'eau) et hydrophobes apolaires (qui retiennent les matières grasses) qui se répartissent préférentiellement aux interfaces et leur confèrent des propriétés émulsifiantes, moussantes, mouillantes, détergentes, dispersantes et stabilisant (Jimoh et Lin, 2019). L'équilibre entre la partie hydrophile et la partie hydrophobe est exprimé sur la valeur numérique d'une grandeur caractéristique appelée HLB (Hydrophilic/Lipophilic Balance) ou Balance Hydrophile/Lipophile. Sa classification selon (Massarweh et Abushaikha, 2020), est basée sur une méthode empirique développée par (Griffin, 1949) et qui fixe les limites de HLB à 1 et 20 respectivement pour l'acide oléique et l'oléate de potassium. La valeur du HLB permet d'identifier les propriétés d'un tensioactif en lien avec son caractère hydrophile. Les propriétés et utilisations des surfactants par rapport à l'échelle HLB et leur solubilité sont les suivantes (Rolland et Milius, 2016) :

- HLB de 0 à 3 : soluble dans l'huile, antimoussant;
- HLB de 2 à 6 : dispersible à soluble dans l'huile, émulsifiant E/H (Eau dans huile);
- HLB de 6 à 9 : dispersible dans l'eau, mouillant;
- HLB de 9 à 20 : soluble dans l'eau, émulsifiant H/E (huile dans eau);
- HLB de 13 à 20 : soluble dans l'eau, détergent, moussant;
- HLB de 17 à 20 : soluble dans l'eau, solubilisant, hydrotrope.

Cette large gamme de valeurs HLB indique, entre autres, le type d'émulsion formé en présence de corps gras comme l'huile : les tensioactifs avec un faible HLB (inférieur à 9) stabilisent les émulsions eau dans huile, tandis que ceux à forte valeur HLB (supérieur à 9) stabilisent les émulsions huile dans eau (Banat et Thavasi, 2019). Avec leurs différentes propriétés, les tensioactifs ont diverses utilisations en industries : ils

servent dans les produits nettoyants, dans les industries pétrolière, pharmaceutique, textile, cosmétique, alimentaire et agricole et aussi dans la nanotechnologie et la biorestauration (Rolland et Milius, 2016). Environ 54% de la production totale des tensioactifs sont utilisés dans les détergents ménagers, 32% seulement étant destinés à un usage industriel, dont la plupart étant d'origine pétrochimique (Banat et al., 2000).

2.1.2 Voies de synthèse possible des tensioactifs

Les tensioactifs sont pour la plupart synthétisés chimiquement et sont dérivés du pétrole dont l'extraction et le raffinage impactent négativement sur l'environnement. Leur large domaine d'utilisation témoigne de leur forte présence et de celle des produits dérivés dans l'environnement avec les rejets industriels et domestiques. Ce qui amène à une forte pollution de l'environnement. Ils sont ainsi qualifiés toxiques, difficilement biodégradables et leurs procédés de fabrication, ainsi que leurs sous-produits peuvent être dangereux (Markande et al., 2021). Comme alternative aux tensioactifs chimiques, des tensioactifs d'origine naturelle se démarquent par une synthèse effectuée à partir de matières renouvelables (huiles végétales par exemple qui constituent 80% des ressources renouvelables utilisées). La partie lipophile de ces tensioactifs est constituée de triglycérides (Le Guenic et al., 2019; Noiret et al., 2002) qui sont des acides gras saturés comme ceux trouvés dans l'huile de coco (avec l'acide laurique) et l'huile de palme (acide palmitique) ou insaturés. La partie hydrophile est issue de coproduits de l'industrie de l'amidon ou de sucres (maïs, betteraves à sucre ou céréales), de poly glycérols, de peptides, d'acides aminés (hydrolysats de protéines) (Noiret et al., 2002).

Toutefois, l'épuisement des ressources dû à l'agriculture intensive et la surexploitation des énergies fossiles constituent un défi d'approvisionnement des surfactants naturels. Il devient nécessaire de changer de paradigme et de miser davantage sur la production de surfactants d'origines microbiennes.

2.1.3 Structures chimiques et classification des tensioactifs

Par leur structure chimique, quatre grandes classes de tensioactifs se distinguent. Cette classification dépend de la nature de la partie hydrophile de la molécule qui donne les propriétés spécifiques à la molécule. La tête hydrophile est la partie polaire qui peut être ionique ou non ionique. La partie lipophile apolaire est une chaîne hydrocarbonée de 4 à 30 atomes de carbone.

Les quatre classes de tensioactifs d'après (Kronberg et al., 2014) sont les suivantes :

- Les tensioactifs anioniques : dont le groupement polaire lié de façon covalente à la partie hydrophobe du tensioactif est chargé négativement en solution aqueuse;

- Les tensioactifs cationiques : dont le groupement polaire est chargé positivement (par exemple : $-N^+(CH_3)_3$) en solution aqueuse ; ce sont généralement des dérivés d'ammonium quaternaires;
- Les tensioactifs non ioniques : le groupement polaire est non ionisable en solution aqueuse. La solubilité dans l'eau est assurée par la formation de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et certaines fonctions de la partie hydrophile. C'est le cas des alcools, éthers, esters, amides contenant des hétéroatomes tels que l'azote ou l'oxygène;
- Les tensioactifs amphotères : ce sont des composés dont la charge dépend du pH. En milieu acide, ils se chargent positivement (tensioactifs cationiques) tandis qu'en milieu basique, ils sont chargés négativement. Pour des pH intermédiaires, certains comportent deux groupements ioniques, l'un cationique et l'autre anionique, qui se neutralisent au pH isoélectrique (charge électrique nette de la molécule nulle). Ce sont des tensioactifs dits zwitterioniques.

La Figure 2.1 suivante donne les différentes classes de tensioactifs dépendamment de la nature de la partie hydrophile :

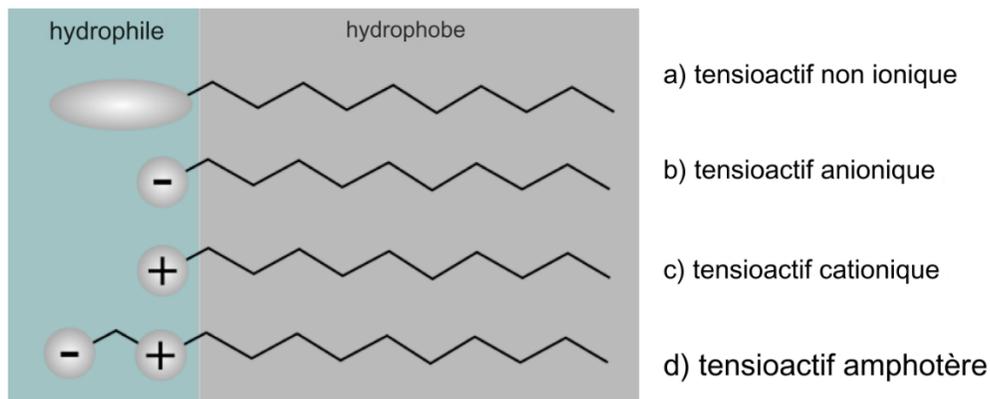


Figure 2.1 Types de tensioactifs en fonction de la charge portée par la partie hydrophile
(Redon, 2019)

2.1.4 Mode d'action des tensioactifs en détergence

La détergence se traduit par l'action d'éliminer les contaminants d'une surface par émulsification. Chimiquement, les surfactants réduisent la tension superficielle interfaciale (entre l'huile et l'eau) et

augmentent de ce fait la solubilité des substances non miscibles à l'eau (Singh et al., 2019). Grâce à leurs queues lipophiles et lipophobes qui leur confèrent leurs caractéristiques de molécules amphiphiles, les tensioactifs sont capables de se lier à la fois à l'eau et aux graisses; ce qui est à l'origine de leur pouvoir nettoyant.

Aux interfaces eau - matière grasse, les tensioactifs se concentrent, laissant immerger leur partie lipophile dans le corps gras et leur partie hydrophile dans l'eau, formant ainsi des agrégats de molécules de tensioactifs appelés micelles (Figure 2.2) qui piègent les contaminants (Mohd-Setapar et al., 2022).

La formation de micelles découle du mélange de deux liquides non miscibles par leurs parties hydrophiles et lipophiles qui se lient préférentiellement à la phase aqueuse et à la phase huileuse.

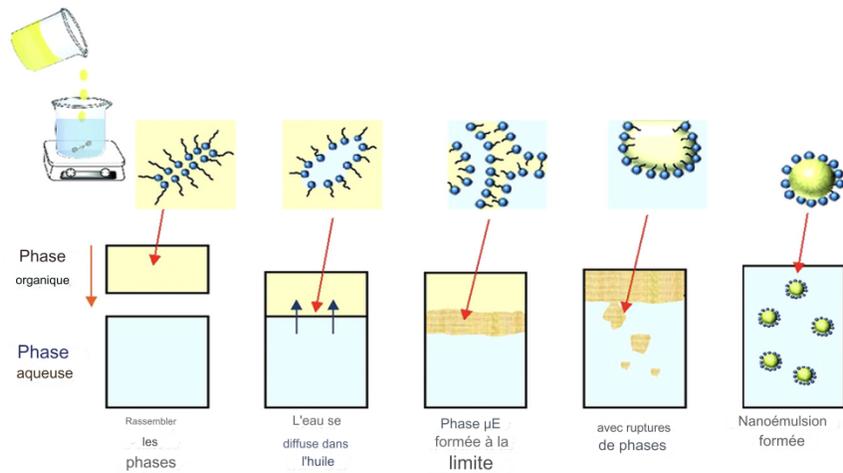


Figure 2.2 Mécanisme de la formation de micelles dans une émulsion huile-eau (Mohd-Setapar et al., 2022)

μE désigne une microémulsion (dispersion stable des phases organique et aqueuse).

L'action détergente se traduit d'abord par un décrochage de la salissure à laquelle la partie lipophile se lie grâce aux molécules tensioactives qui sont absorbées par la salissure (graisse, particules solides, etc.). Puis, on note une solubilisation de la salissure emprisonnée par les micelles formées par les molécules tensioactives créant ainsi une émulsion stable. Cette émulsion est enfin entraînée puis éliminée dans l'eau de rinçage (Mohd-Setapar et al., 2022). La formation de mousse est un effet du pouvoir secondaire du tensioactif par emprisonnement de l'air.

2.1.5 Synergie d'actions enzymes – tensioactifs

Les enzymes occupent une place importante dans la composition des produits de nettoyage. Elles sont utilisées comme ingrédients fonctionnels dans les détergents et contribuent au nettoyage de façon efficace. Elles sont respectueuses de l'environnement et économes en énergie de par les possibilités de nettoyage à basse température par l'action enzymatique (Singh et al., 2016). Lors d'un nettoyage, les tensioactifs solubilisent la salissure par un décrochage de celle-ci de la surface à nettoyer. Cependant, cela fonctionne bien pour les petites saletés particulières et les salissures grasses liquides. En effet, les salissures à base de longues chaînes de polymères ou de graisse solide peuvent présenter une adhérence beaucoup plus forte, ce qui rend difficile leur solubilisation complète (Hellmuth et Dreja, 2016). C'est là qu'interviennent les enzymes pour maximiser l'action des surfactants. En effet, ils décomposent les polymères à haut poids moléculaire en plus petites molécules, favorisant ainsi leur solubilisation et leur dispersion par les surfactants dans la solution de lavage. Hellmuth et Dreja, 2016 ont affirmé que la plupart des enzymes détergentes, telles que les protéases, les amylases, les cellulases et les lipases dégradent les molécules complexes, qui ne peuvent pas être solubilisées directement par les agents de surface et que sans ces tensioactifs, la plupart des produits de dégradation enzymatique resterait collée à la surface.

2.2 Biosurfactants : surfactants d'origine microbienne

Les biosurfactants (BS) désignent des tensioactifs d'origine biologique synthétisés pour la plupart de manière extracellulaire par les microorganismes, ou faisant partie de la membrane cellulaire (Jahan et al., 2020). Ehrhardt et al., 2015 les définissent comme des groupes de composés chimiques produits par des bactéries, des champignons ou des levures par biodégradation de matières premières renouvelables contenant une ou plusieurs sources de carbone.

Sur le plan environnemental, de la gestion et de la préservation des ressources naturelles, ils présentent plus d'intérêts que leurs homologues chimiques ou d'origine naturelle. Toutefois, leurs grandes échelles de production et d'application sont limitées d'une part par le coût de production élevé (le substrat pouvant représenter jusqu'à 50% du coût total de production (De Almeida et al., 2016) et d'autre part par la faible compréhension de leur métabolisme, de leurs interactions avec les cellules et l'environnement abiotique (Makkar et al., 2011). Ceci entrave considérablement la croissance du marché des BS même si leur grande diversité structurelle, leur faible toxicité et biodégradabilité leur permettent d'être largement utilisés dans les produits cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires comme émulsifiants, humectants ou conservateurs; en détergence et en bioremédiation (décontamination de sites pollués) (Markande et al., 2021).

Les BS sont classés selon leur composition chimique, c'est-à-dire par les molécules constituant les parties hydrophiles et hydrophobes et selon les microorganismes producteurs (Banat et Thavasi, 2019).

2.2.1 Microorganismes producteurs et types de BS

Plusieurs microorganismes sont réputés comme d'excellents producteurs de biosurfactants. Les membres des genres *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus* et *Candida* sont les plus largement impliqués dans la production de différents types de biosurfactants (Singh et al., 2019). Selon le type de microorganismes, les sources de carbone et d'azote, la polarité et la composition chimique, ils peuvent être classés en BS de faible poids moléculaire et en BS de poids moléculaires élevés. Les premiers abaissent efficacement les tensions superficielle et interfaciale et sont entre autres les glycolipides (GL), les lipopeptides ou lipoprotéines (LP) et les phospholipides (PL). Les seconds, plus efficaces comme agents stabilisateurs d'émulsion, comprennent entre autres les lipopolymères et les lipopolysaccharides (Banat et Thavasi, 2019).

En exemple, les LP sont une classe importante de biosurfactants et sont des peptides cycliques amphiphiles composés de sept ou dix acides aminés liés à une structure d'acide gras hydrophobe; ils possèdent des propriétés d'agents de surface remarquables et sont synthétisés par une grande variété de microorganismes (Kanlayavattanakul et Lourith, 2010) comme les bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas* qui représentent la source la plus importante (Smyth et al., 2010). Dans le groupe des *Bacillus* largement plus étudié, on retrouve principalement la surfactine, la lichénysine, l'iturine et la fengycine qui sont des métabolites secondaires. Ils sont isolés de milieux de fermentation et faisant partie des biosurfactants les plus importants grâce à leurs excellentes propriétés d'agents de surface, antifongiques et antibactériennes (Bonmatin et al., 2003). La surfactine et la lichénysine ont la structure cyclique d'un heptapeptide fermé soit par un acide β -aminé ou un acide gras β -hydroxylé contenant 13 ou 15 atomes de carbone. La chaîne d'acide gras β -hydroxy de la surfactine lui confère son activité tensioactive avec la formation des micelles en solution par la tête polaire opposée à la plupart des chaînes latérales hydrophobes (Detournay, 2023).

La lichénysine ne diffère de la surfactine que par la présence de L-Gln (énantiomère L de la glutamine) à la place de Glu (glutamate ou acide glutamique) en position 1 de la séquence peptidique (Bonmatin et al., 2003), tous deux portant une queue hydrophobe (Kanlayavattanakul et Lourith, 2010).

L'iturine est également un heptapeptide, mais diffère de la surfactine par une liaison d'acide gras β -aminés avec chaîne carbonée de 14 à 17 atomes de carbone; tandis que la fengycine est composée de dix acides aminés avec une longueur de chaîne d'acide gras de C₁₄-C₁₈ (Smyth et al., 2010). La structure chimique de la surfactine est illustrée à la Figure 2.3.

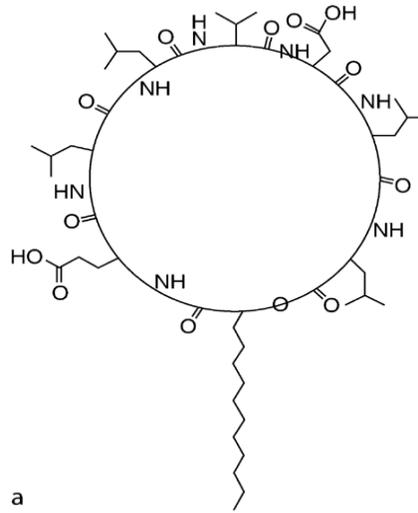


Figure 2.3 Structure de la surfactine lipopeptide cyclique (a) de *Bacillus sp.* (Smyth et al. 2010)

La différence structurelle de la surfactine et de la lichénysine est montrée par la représentation schématique suivante (Figure 2.4) :

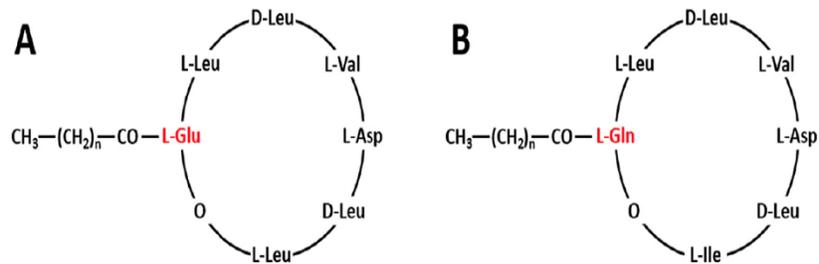


Figure 2.4 Surfactine (A) – Lichénysine (B) (Gudiña et Teixeira, 2022)

Les lipopeptides de *Pseudomonas* sont constitués d'un acide gras attaché à un peptide cyclisé; leur biosynthèse est régulée par le système des peptides synthétases non ribosomiques. Les lipopeptides cycliques de *Pseudomonas* sont principalement de quatre types : viscosine, amphisine, tolaasine et syringomycine (Chauhan et al., 2023) Leur utilisation concerne principalement les agents de biocontrôle dans les plantes, les émulsifiants, les anticorrosifs dans les industries pétrolières et les agents antimicrobiens

dans les industries pharmaceutiques et biomédicales. Un des avantages de son utilisation comme agent de biocontrôle dans les plantes est mis en détail par Chauhan et al., 2023 dans leurs travaux (Figure 2.5).

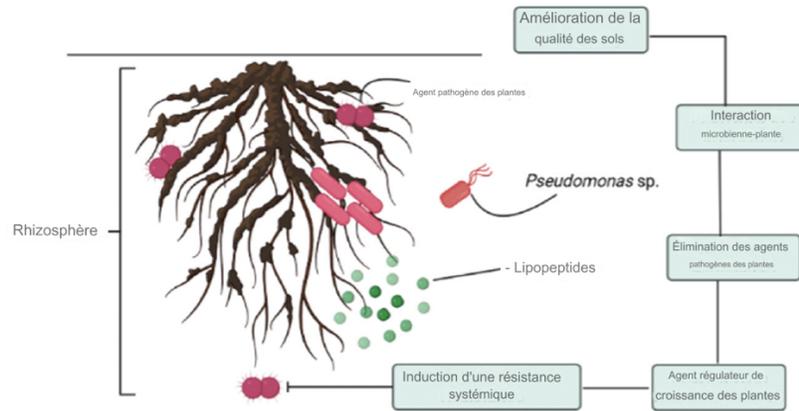


Figure 2.5 Développement des plantes grâce aux lipopeptides de *Pseudomonas sp.* (Chauhan et al., 2023)

Dans l'amélioration de la qualité du sol, grâce aux lipopeptides de *Pseudomonas*, une résistance systémique est développée chez les plantes contre les pathogènes en partant de l'interaction plante-microbe jusqu'à l'élimination des agents pathogènes et la croissance des plantes par les agents régulateurs.

Les glycolipides (GL) sont quant à eux une famille de biosurfactants extracellulaires constitués d'une queue d'acide gras hydrophobe de 16 ou 18 atomes de carbone et d'une tête d'hydrate de carbone hydrophile; les 2 pôles étant liés par un groupe ester ou un éther. Suivant la nature de l'hydrate de carbone hydrophile se distinguent les sophorolipides (sophorose), les rhamnolipides (rhamnose), les lipides de mannosylérythritol (mannose et érythritol) et les lipides de tréhalose (tréhalose).

Les GL de type sophorolipides (SL) et des lipides de mannosylérythritol (mannosylerythritol lipids, MEL) sont produits respectivement par la levure *Starmerella (Candida) bombicola* (Elshafie et al., 2015) et le genre *Pseudozyma* (Morita et al., 2008).

Les glycolipides de types lipides de tréhalose sont produits par les membres du genre *Rhodococcus* en présence d'hydrocarbures liquides dans le milieu de culture; ils sont principalement liés aux cellules et leur hydrate de carbone est du tréhalose. Leurs rôles physiologiques principaux sont divers et comprennent la participation à l'absorption de substrats insolubles dans l'eau, la promotion de l'adhérence des cellules aux

surfaces hydrophobes et l'augmentation de la résistance des rhodocoques aux influences physicochimiques. Ils se caractérisent en outre par une tension superficielle et interfaciale, une concentration micellaire critique et une activité émulsifiante, tout comme des surfactants microbiens et synthétiques efficaces (Kuyukina et Ivshina, 2019).

Les lipopolysaccharides sont définis comme faisant partie de la grande famille des BS polymères de haut poids moléculaire qui, contrairement aux BS de faible poids moléculaire, n'abaissent pas forcément la tension superficielle, mais plutôt la tension interfaciale entre des liquides non miscibles et forment des émulsions stables (Banat et Thavasi, 2019). En exemple, les LPS les plus étudiés sont l'émulsan d'*Acinetobacter calcoaceticus* et le liposan de *Candida lipolytica*.

L'émulsan (1000 kDa en masse moléculaire) est un hétéropolysaccharide lié à un acide gras par des liaisons ester et amide. Il est constitué à environ 80% (p/p) de lipopolysaccharides et de 20% d'exopolysaccharides. C'est un excellent agent émulsifiant, très efficace, même à faible concentration (de 0,001% à 0,01%) pour les hydrocarbures dans l'eau (Mercaldi et al., 2008).

Le liposan constitué à 83% d'hydrates de carbone et 17% de protéines est un produit extracellulaire (métabolite secondaire) de la fermentation de *Candida lipolytica* pendant la phase stationnaire, en présence l'hexadécane comme substrat carbonique (Banat et Thavasi, 2019). Chimiquement, la teneur en sucre du liposan est similaire à celle de emulsan, par l'hétéropolysaccharide composé de glucose, de galactose, de galactosamine et d'acide galacturonique (Vijayakumar et Saravanan, 2015).

Le Tableau 2-1 présente un résumé de quelques types de biosurfactants les plus efficaces et prometteurs avec les différents microorganismes producteurs et leurs domaines d'application.

Tableau 2-1 Quelques exemples de biosurfactants et microorganismes producteurs (adapté de Makkar et al., 2011)

Biosurfactants	Microorganismes producteurs		Caractéristiques des BS/ Applications	Références	
	Genres	Espèces			
Lipopeptides	Surfactine	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	Antimicrobien, antifongique; Dégrade certains hydrocarbures	(Ehrhardt et al., 2015) (Reis et al., 2004)
			<i>licheniformis</i>	Pharmaceutique; Puissant tensioactif, réduit la TS à 28,5 mN m ⁻¹ Faible CMC de 15 mg L ⁻¹	(Thaniyavarn et al., 2003)
	Fengycine	<i>mojavensis</i>	Activité antimicrobienne;	(Hanan et Nasri, 2016)	
	Surfactine				
	Tensine	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	Inhibiteurs d'agents phytopathogènes; Activité antibactérienne	(Nielsen et al., 2000)
Glycolipides	Sophorolipides	<i>Candida</i>	<i>bombicola</i>	Pharmaceutique; Cosmétique	(Daniel et al., 1998)
			<i>Starmerella</i>	<i>bombicola</i>	
	Lipides mannosylérythritol (MEL)	<i>Pseudozyma</i>	<i>siamensis</i> <i>shanxiensis</i>	Industrie alimentaire; Cosmétique; Nutraceutique	(Morita et al., 2008)
	Rhamnolipides	<i>Alcanivorax</i>	<i>borkumensis</i>	Bioremédiation du pétrole	(Mandalenaki et al., 2021)
<i>Pseudomonas</i>			<i>aeruginosa</i>	Traitement de boues d'hydrocarbures; Dispersion de biofilms	(Kezrane et al., 2020) (Bordas et Lafrance, 2001)
Lipopolymères	<i>Acinetobacter</i>	<i>calcoaceticus</i>	Biodésémulsifiant actif pour l'industrie pétrolière	(Akbari et Biria, 2018)	
Lipopolysaccharides					

2.2.2 Facteurs influençant la production de BS

Pour une production optimale de BS, il est nécessaire de comprendre les besoins ainsi que les paramètres et conditions opératoires spécifiques à chaque microorganisme. Ces besoins se traduisent par l'apport en carbone et/ou en azote, en minéraux, en macro et micronutriments; les paramètres étant entre autres la température, le pH, la vitesse d'agitation et l'aération. Ces paramètres affectent la production de BS par leurs effets sur la croissance ou l'activité cellulaire et de ce fait, sur les métabolites secondaires qui sont générés (Mohanty et al., 2021).

Le modèle suivant, Figure 2.6, illustre la production de BS par fermentation microbienne en bioréacteurs.

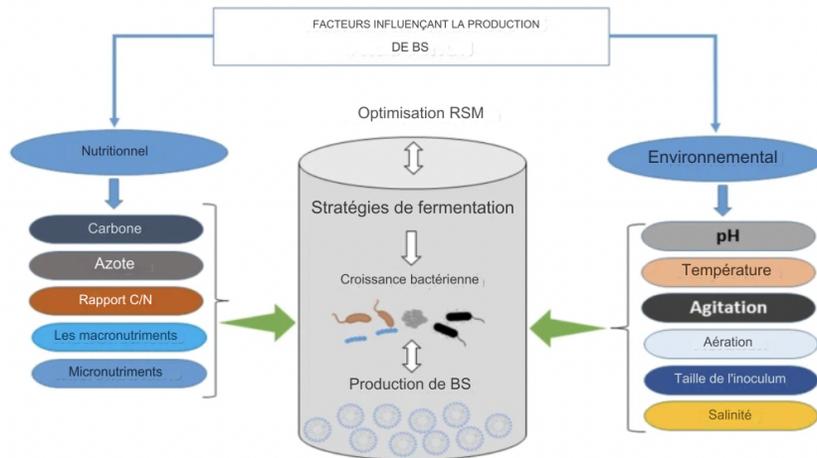


Figure 2.6 Modèle schématique de la production de BS – paramètres et conditions opératoires (Dias et Nitschke, 2023)

Les sources de carbone et d'azote et le pH influent sur la production de BS; en effet, ils induisent la croissance cellulaire et affectent ainsi la production de composés extracellulaires tels que les BS, vice versa (Mohanty et al., 2021).

2.2.2.1 Effet de la source de carbone et/ou d'azote

La nature et la quantité de BS produits dépendent généralement des sources de carbone et d'azote utilisées. Il est important d'avoir un ratio carbone/azote (C/N) optimal de 6:1 à 10:1 pour la croissance cellulaire et la production de métabolites (Kokou et al., 2023). Les sources de carbone (synthétique ou semi-synthétique) peuvent être du glucose, du sucre commercial, du jus de canne à sucre, des résidus de distillation, de la

mélasse de canne à sucre, du glycérol, du mannitol, de l'huile de soja (Reis et al., 2004) Les sources d'azote quant à elles peuvent être du sulfate d'ammonium, du nitrate de potassium et d'ammonium, ainsi que la farine de soja (Akbari et Biria, 2018). Ils sont essentiels à la fabrication des acides aminés, des acides nucléiques, de certains glucides et lipides, et de la plupart des coenzymes. L'azote sous forme organique (protéines, acides aminés, urée, etc.) comme inorganique (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) est nécessaire à la bonne croissance des microorganismes dans le milieu de culture. Toutefois, tout comme les sources de carbone synthétiques, les sources d'azote synthétiques sont aussi très coûteuses, surtout à grande échelle.

Ainsi, les milieux résiduels fermentescibles servent de plus en plus comme alternative au milieu synthétique et semi-synthétique. En effet, ils comportent tous les nutriments nécessaires au métabolisme des microorganismes producteurs de BS et d'enzymes, que ce soit du carbone, de l'azote et des sels minéraux (Dabaghi et al., 2023). Ces types de résidus nécessitent au préalable un amendement de leurs solides totaux et une maîtrise de leur pH afin que les microorganismes puissent y croître. Ils sont également bon marché et ne nécessitent généralement que des frais de transport grâce aux entreprises qui optent pour la valorisation de leurs sous-produits via la production de molécules d'intérêts (Godard, 2020).

Une souche de *Bacillus subtilis* a été fermentée à partir des eaux usées de farine de manioc (Manipueira) pour la production de surfactines (lipopeptides); une concentration en surfactine de 2 g/L en 72 h de fermentation a été obtenue lors de cette expérimentation (Nitschke et al., 2004).

Également, la fermentation de *Candida bombicola* en bioréacteur de 5 L dans un milieu à base de graisse de poulet a permis la production de 27,86 g/L de sophorolipides en 120 h de fermentation, d'après les résultats des travaux de (Fontoura et al., 2020). Parmi les autres résidus fermentescibles notables répertoriés dans la littérature, notons les résidus de la transformation de l'ananas enrichi en glycérol (Ehrhardt et al., 2015) et la farine de soja comme source d'azote pour la production de lipopeptides cycliques par *Acinetobacter calcoaceticus* (ATCC 23055) (Akbari et Biria, 2018). Toutefois, la source de carbone peut, à une certaine concentration, être inhibiteur de la croissance microbienne et/ou de l'activité cellulaire par une forte pression osmotique ou une inhibition des enzymes par le substrat.

2.2.2.2 Effet du pH

La croissance des microorganismes et le métabolisme cellulaire sont intrinsèquement reliés au pH du milieu de croissance. En effet, le pH est un facteur environnemental important qui influence la stabilité et la solubilité des métabolites.

Lee et al., 2018 situent le pH optimal entre 7 et 8 pour la croissance cellulaire des isolats de *Bacillus algicola* (003-Phe1), de *Rhodococcus soli* (102-Na5), d'*IsotERICOLA chiayiensis* (103-Na4), et *Pseudoalteromonas agarivorans* (SDRB-Py1). En revanche, dans les travaux de (Konishi et al., 2018), un pH acide de 3,5 était

noté dans le milieu pour la production de sophorolipides par la souche *Candida floricola* ZM1502 avec un rendement de 169 g/L après 180 h de fermentation alors que le milieu était supplémenté d'huile de soja et de glycérol résiduels.

Zou et al., 2014 et Joice et Parthasarathi, 2014 ont mentionné que le pH optimal pour la synthèse des surfactants biologiques se situe entre 6,0 et 6,5. La production de BS était faible pour des pH supérieurs à 6,5 alors qu'à un pH compris entre 4 et 4,5 la bactérie ne pouvait plus abaisser la tension superficielle du milieu de croissance. En effet le pH du milieu peut affecter la solubilité des nutriments et leur disponibilité pour les microorganismes dont la croissance cellulaire et la production de métabolites secondaires vont ralentir. La solubilité de certains ions ou composés à des pH spécifiques limite leur utilisation par les cellules.

2.2.3 Méthodes d'évaluation de la production de BS

2.2.3.1 Suivi de croissance cellulaire

La détermination des cellules totales et des spores viables est effectuée par la mesure de la densité optique (DO) ou l'évaluation de la concentration cellulaire en Unité Formatrice de Colonie par millilitre (UFC/mL).

La DO permet une mesure de la concentration en microorganismes (en CFU/mL) par l'utilisation de leur longueur d'onde ou absorbance du visible (660 nm pour les *Bacillus*). Plus le nombre de microorganismes augmente dans le milieu de culture, plus le milieu devient trouble et la DO augmente en conséquence. La DO est donc fonction de la concentration en microorganismes (Green et Goldman, 2021).

La mesure de la concentration cellulaire en UFC/mL se fait par dénombrement des cellules par une série de dilution sur un milieu gélosé spécifique à chaque souche. Les plaques de gélose sont ensuite incubées à l'étuve à la température optimale des souches. Les boîtes de pétri comptant entre 30 et 300 colonies sont alors comptées et rapportées en UFC (Green et Goldman, 2021).

2.2.3.2 Extraction des BS

La récupération des composés extracellulaires produits par les microorganismes pendant leur phase de croissance peut se faire uniquement par précipitation à l'acide chlorhydrique (HCl) 6N du surnageant du bouillon de culture ou par précipitation suivie d'une purification par extraction aux solvants organiques. Avec la méthode de la précipitation par HCl, le précipité obtenu est mis en granulés, séché et utilisé directement pour la caractérisation biochimique (Nitschke et al., 2004).

Plusieurs méthodes d'extraction aux solvants ont été développées pour purifier le précipité:

- Plaza et al. (2015) ont utilisé un mélange d'acétate d'éthyle et de méthanol (4:1, v/v). L'extrait organique obtenu est filtré et séché à l'évaporateur rotatif;

- Akbari et Biria, 2018 ont utilisé un mélange de chloroforme et de méthanol (2:1, v/v). Le solvant de l'extrait organique obtenu est séché à l'évaporateur rotatif;
- Joshi et al., 2016 ont utilisé le précipité qui est mélangé à de l'eau avec un pH ajusté à 8 par de la soude (NaOH) à normalité 1N. Le BS est récupéré par pulvérisation au "Spray Dryer".

2.2.3.3 Mesure de la tension de surface (TS)

La tension superficielle ou de surface (TS) est la quantité d'énergie utilisée par unité de surface pour transférer une molécule de la phase de masse à la surface (Moshtagh et al., 2021). Elle est une mesure indirecte de la concentration en surfactants et comme indicateur qualitatif de son efficacité. Un agent tensioactif est un corps qui, même utilisé en faible quantité, modifie de façon importante la tension superficielle, en particulier celle de l'eau. Par exemple, un bon tensioactif peut abaisser la tension superficielle de l'eau de 72 à 35 mN/m et la tension interfaciale (tension entre les liquides non polaires et polaires) du n-hexadécane de 40 à 1 mN/m (Mulligan, 2005). Il a été rapporté par (Fox et Bala, 2000) que la TS de l'eau pouvait être réduite de 72 à 27 mN/m avec la surfactine produite par *Bacillus subtilis*.

2.2.3.4 Mesure de l'indice d'émulsification (IE₂₄)

Une des mesures qualitatives et quantitatives des tensioactifs est la détermination de leur pouvoir émulsionnant. Une émulsion est un mélange de deux corps non miscibles, c'est-à-dire non solubles, entre eux et dont l'aspect ne variera pas avec le temps. Les molécules tensioactives stabilisent les gouttelettes d'huile dans l'eau ou d'eau dans l'huile. L'émulsion découle de la formation de micelles. En effet, les tensioactifs s'organisent autour de la gouttelette d'huile en présentant leur partie hydrophobe du côté de l'huile et leur partie hydrophile du côté de l'eau (Mohd-Setapar et al., 2022).

L'activité d'émulsification est évaluée par la capacité d'un biosurfactant à générer une turbidité due aux hydrocarbures en suspension dans un système liquide (Moshtagh et al., 2021). La méthode développée par (Cooper et Goldenberg, 1987) et adaptée par (Akbari et Biria, 2018) porte sur la mesure de l'émulsion formée par un mélange d'hydrocarbures (Kérosène) et une solution de surfactants dans un tube par rapport à la hauteur totale des deux liquides (émulsion formée et phase aqueuse).

2.2.3.5 Mesure de la CMC

La CMC est la valeur limite de concentration en tensioactifs à partir de laquelle on a la formation d'agrégats ordonnés de molécules. Les molécules de tensioactifs, comportant une partie hydrophile et une partie hydrophobe, sont fortement absorbées aux interfaces eau/air. À partir d'une certaine concentration, l'interface est saturée et les molécules, au sein même du liquide, vont s'associer pour former des micelles.

Ce phénomène entraîne des anomalies dans les propriétés physiques et électriques des solutions détergentes. Ainsi, lorsque l'on augmente la concentration des tensioactifs, certaines propriétés changent brusquement (Nardello-Rataj et Ho Tan Tai, 2006). La CMC d'un biosurfactant efficace est basse, c'est-à-dire qu'une concentration réduite en biosurfactant est suffisante pour réduire la TS (Moshtagh et al., 2021). La CMC se détermine en traçant la variation d'une propriété physique donnée (par exemple : tension superficielle, conductivité électrique, abaissement cryoscopique, solubilisation de colorant, diffusion de la lumière, etc.) en fonction de la concentration en tensioactif. Pour la TS, la concentration à partir de laquelle celle-ci augmente fortement correspond à la CMC (Moshtagh et al., 2019). La CMC peut aussi être déterminée à partir du point de rupture de la tension de surface en fonction du logarithme de sa concentration.

Il a été rapporté par (Sun et al., 2019) que la CMC des BS varie généralement de 10 et 540 mg/L selon leur pureté et leur composition.

2.2.3.6 Analyse moléculaire des produits de fermentation

Pour déterminer leur composition et leur structure, les molécules de BS extraits et purifiés peuvent être analysées grâce à des techniques d'identification biochimique et moléculaire telles que la spectrométrie de masse (MS), la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS), la chromatographie sur couche mince (CCM) et la spectroscopie infrarouge de Fourier (FTIR).

3 CONTEXTE ET OBJECTIFS D'ÉTUDE

L'objectif général de ce projet de recherche est la production de BS entrant dans la formulation des produits de nettoyage par fermentation microbienne à partir des milieux résiduels fermentescibles. Afin de mener à bien l'étude, plusieurs objectifs spécifiques ont été définis:

Objectif spécifique (OS) 1. Effectuer une revue de littérature à jour pour la sélection de microorganismes capables de se multiplier et de produire des BS à partir de milieux résiduels entrant dans la formulation des produits nettoyants;

Objectif spécifique 2. Identifier et sélectionner des milieux résiduaires fermentescibles (MRF) disponibles en quantité suffisante et pérenne au Québec et capables d'induire la production de BS chez les microorganismes sélectionnés;

Objectif spécifique 3. Réaliser des stratégies de fermentations pour la croissance microbienne en fioles agitées avec les souches et MRF choisis;

Objectif spécifique 4. Optimiser la production des BS en erlenmeyers pour les fermentations ultérieures en bioréacteurs de 5L;

Objectif spécifique 5. Effectuer la mise à l'échelle des conditions de fermentation optimisées en bioréacteurs de 5 L;

Objectif spécifique 6. Caractériser les BS obtenus par fermentation microbienne et les comparer à leurs homologues synthétiques obtenus de Sani Marc.

4 MATÉRIELS ET MÉTHODES

4.1 Matières premières : souches microbiennes - boues et eaux usées d'industries

Les matériels utilisés dans cette étude étaient principalement des microorganismes, des milieux semi-synthétiques pour la culture microbienne, des boues secondaires de pâtes et papiers et des eaux usées résiduelles d'industries d'amidon et de brasserie.

4.1.1 *OS1 : Sélection des souches microbiennes*

Le premier objectif a permis d'identifier à partir de la littérature scientifique, plusieurs souches pour la formulation de produits de nettoyage biologiques par fermentations microbiennes.

La sélection des microorganismes est effectuée sur la base de leur potentiel de production de surfactants microbiens à partir des milieux semi-synthétiques (MSS) appropriés et de leur « biosafety level 1 » (BSL1 niveau de biosécurité 1) relativement à l'utilisation des microorganismes. Le BSL1 signifie un faible niveau de risques pour les utilisateurs et représente un niveau de confinement de base qui repose sur des pratiques microbiologiques standard (Emmert et Biosafety, 2013).

Les microorganismes sélectionnés sont achetés sous forme lyophilisée à la compagnie Cederlane fournisseur des produits ATCC¹ au Canada. Le code spécifique, la revitalisation sur Milieux Semi-Synthétiques (MSS) et le stockage de chaque microorganisme pour les utilisations ultérieures lors des travaux sont expliqués en 8.1 et en 8.3.

Les MSS sont utilisés pour revitaliser les cellules lyophilisées (1.1), pour préparer des inocula en fermentation et pour constituer le contrôle positif de fermentation quant à la croissance cellulaire et à l'extraction des métabolites secondaires. L'inoculum de préculture 1 (PC1) est préparée en ensemençant sur bouillon nutritif de MSS une colonie de la souche puis à incuber sur agitateur rotatif.

Le Tableau 4-1 et la Figure 4.1 fournissent les renseignements sur les souches utilisées et les biosurfactants produits par celles-ci.

¹ American Type Culture Collection : société privée américaine spécialisée dans la recherche et le développement d'expertise pour l'identification, la caractérisation, la conservation et la distribution d'une large gamme de cellules et de microbes.

Tableau 4-1 Souches microbiennes, BS recherchés et propriétés tensioactives

Souches sélectionnées	BS recherchés	Propriétés	Références
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Lipopeptide : surfactine	Activité antimicrobienne antibiofilm); Tensioactive, moussante, faible CMC (10 mg/L), biodégradable	(Nazareth et al., 2021) (Ehrhardt et al., 2015)
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	Lipopeptide : lichénysine	Tensioactive, Faible CMC (10 mg/L), mouillabilité	(Gudiña et Teixeira, 2022) (Joshi et al., 2016)
<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	Glycolipide: sophorolipides	Tensioactive, large gamme de température et de pression, biodégradabilité, antimicrobien, virucide	(Roelants et al., 2019) (Elshafie et al., 2015)

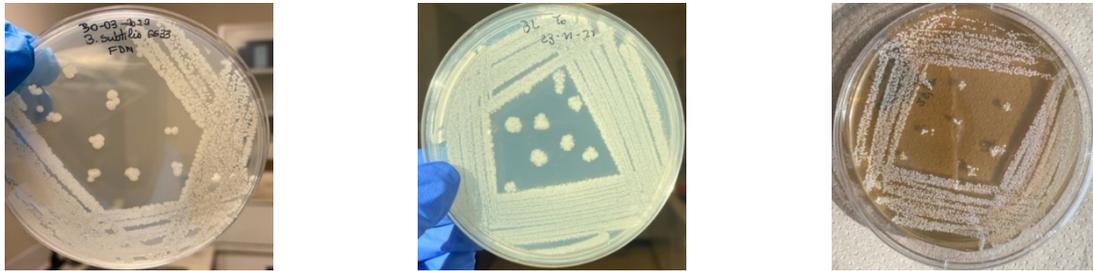


Figure 4.1 *Bacillus subtilis* (a) - *Bacillus licheniformis* (b) – *Starmerella bombicola* (c)

4.1.2 OS2 : Sélection MRF disponibles dans la province de Québec

Les milieux résiduels fermentescibles (MRF) utilisés sont essentiellement des boues secondaires d'industrie de pâte et papier, des eaux usées d'industrie d'amidon et d'industrie brassicole.

Les **eaux usées d'industrie d'amidon** appelées SIW (Starch Industrial Wastewater) proviennent de l'entreprise ADM Inc. dans la ville de Candiac. C'est une entreprise de transformation de maïs qui génère des eaux usées provenant du procédé de transformation et des eaux de lavage de cuve.

Les **boues secondaires d'industrie de pâte et papier** appelées Kruger proviennent de l'entreprise du même nom Kruger à Trois-Rivières qui est une entreprise de pâte et papier générant des boues secondaires (boues activées) qui proviennent du traitement des eaux de procédés.

Les **eaux usées de brasserie** sont des eaux usées provenant de lavage des cuves après fermentation des levures de l'entreprise Miellerie King à Kingsey Falls.

Pour chaque MRF une préparation (amendement) et une caractérisation sont faites; il s'agit de mélanger pour chaque réception les différentes chaudières reçues, de déterminer essentiellement les solides totaux

(ST) et les matières en suspension (MS), ainsi que les caractéristiques biochimiques (sucres) puis de réajuster les ST à 15 g/L soit par décantation, centrifugation ou dilution et de les stocker à 4°C ou – 20°C pour les besoins ultérieurs. Une concentration en ST de 15 g/L a été adoptée au début des essais afin de permettre au microorganisme de trouver dans le MRF un minimum de nutriments pour assurer une croissance cellulaire.

Le ratio C:N est aussi pris en compte, il est important d’avoir un « ratio C : N » de 6:1 à 10:1 (Kokou et al., 2023) pour permettre un bon équilibre entre les métabolismes du carbone et de l'azote; ils influencent grandement sur la croissance et la production de métabolites pour certaines souches microbiennes (Ginésy et al., 2017).

En exemple, le Tableau 4-2 détaille les premières réceptions de MRF avec leur désignation et l’entreprise de production.

Tableau 4-2 MRF sélectionnés, désignations et provenance

MRF	Désignations	Entreprises
Eaux usées d’industries d’amidon	Starch industrial wastewater (SIW)	ADM Inc, Candiac
Boues activées de pâtes et papiers	Kruger	Kruger, Trois-Rivières
Eaux usées d’industries de brasserie	Brewery Fermentation wastewater (BFW) Brewery distillation sludge (BDS)	Miellerie King, Kingsey Fall

La Figure 4.2 montre les premières réceptions de MRF qui ont été utilisées lors des premières fermentations en erlenmeyers après amendement et analyses.



Figure 4.2 Milieux résiduels fermentescibles

4.1.2.1 Détermination des solides totaux (ST)

Des coupelles en aluminium sont pesées à vide (m_0) puis un volume V d'échantillon de 20 mL y est ajouté. La coupelle contenant l'échantillon est séchée à 105 °C au four pendant 24h jusqu'à une masse constante. Après séchage, pour chaque coupelle, la masse (m_1) est pesée pour déterminer la concentration en solides totaux (ST) avec la formule suivante :

Équation 4.1 Détermination du solide total (ST)

$$ST \text{ (g/L)} = \frac{m_1 - m_0}{V}$$

Avec m_1 : masse après séchage (g); m_0 : masse à vide de la coupelle (g); V : volume d'échantillon (L). La concentration en ST de l'échantillon est le résultat de la moyenne entre les deux mesures de duplicata.

4.1.2.2 Détermination de la matière en suspension (MS)

Un volume V d'échantillon de 20 mL contenu dans un tube à essai est centrifugé à 9000 rpm pendant 10 min à 14 °C. Après centrifugation, le surnageant n'est pas retenu alors que le culot est récupéré en y ajoutant un peu d'eau et en agitant avec le vortex afin d'homogénéiser. Des coupelles en aluminium sont pesées à vide (m_0), puis les échantillons y sont ajoutés pour être séchés au four à 105 °C pendant 24 h. Après séchage, pour chaque coupelle, la masse (m_1) est pesée pour déterminer la concentration des matières en suspension (MS) avec la formule suivante :

Équation 4.2 Détermination de la matière en suspension (MS)

$$MS \text{ (g/L)} = \frac{m_1 - m_0}{V}$$

Avec m_1 : masse après séchage (g); m_0 : masse à vide de la coupelle (g); V : volume d'échantillon (L). La concentration en MS de l'échantillon est le résultat de la moyenne entre les deux mesures.

4.1.2.3 Autres analyses

Des analyses biochimiques de la composition en sucre, du carbone et de l'azote total, ainsi que des sels minéraux et métaux sont effectuées par l'équipe du laboratoire du Centre Eau Terre Environnement de l'INRS.

Composition en sucre : la méthode utilisée est la chromatographie en phase liquide couplée à un Spectromètre de Masse (LC-MS). Les échantillons sont dilués avec un solvant adapté et filtrés avant l'injection dans la colonne LC; la filtration permet d'éviter le blocage des composants de l'instrument ou des colonnes LC.

Carbone et azote total : la méthode Shimadzu est utilisée par injection des échantillons dans un four à combustion à 680 °C. L'analyseur permet de mesurer la quantité totale de carbone et d'azote organiques contenus dans un échantillon par oxydation catalytique. L'échantillon se décompose et est converti en dioxyde de carbone qui est refroidi, déshumidifié puis détecté à l'aide d'un analyseur de gaz infrarouge noté NDIR. La concentration de TC (carbone total) dans l'échantillon est obtenue par comparaison avec une formule de courbe d'étalonnage.

Sels minéraux et métaux : la méthode ICP (Inductively Coupled Plasma) est utilisée pour le dosage des éléments en traces dans un échantillon.

L'analyse des oligo-éléments par la spectrométrie d'émission optique à plasma inductif utilise un gaz atomique électriquement neutre, mais très ionisé qui est le plasma. Une digestion acide (par HNO₃, HCl) est effectuée au préalable; il s'en suit une analyse qui est visualisée par des pics d'intensité de signal de l'échantillon analysé par rapport à ceux d'une solution étalon.

4.2 Approches expérimentales

Après sélection des microorganismes et des milieux de culture, les travaux de production de BS microbiens se déroulent comme suit :

- Des fermentations en fioles agitées pendant 48 h pour chaque microorganisme sur son milieu semi-synthétique spécifique. Ceci permet d'avoir un témoin de la croissance cellulaire, de la production de métabolites secondaires et de l'extraction des BS recherchés.
- Ensuite, des fermentations en fioles agitées de chaque microorganisme sur tous les MRF à 15 g/L de solides totaux. Ces fermentations permettent d'évaluer la croissance cellulaire en UFC/mL, de déterminer la concentration de composés extracellulaires produits en gramme par litre de bouillon fermenté, de mesurer les tensions interfaciales. Ces résultats permettront de sélectionner les microorganismes les plus performants dans les MRF.
- Ainsi, un plan d'optimisation expérimentale est réalisé avec design-expert 12 en fonction de la concentration des solides totaux des MRF, du pourcentage d'inoculum et de la température de croissance des microorganismes. Les réponses obtenues du plan expérimental sont: la concentration des composés extracellulaires après des fermentations de 0, 24, 48 et 72 h de fermentation ainsi que de l'indice d'émulsification (IE_{24}) (méthode détaillée en 4.3.3).
- Enfin, les résultats optimisés seront mis à l'échelle en bioréacteurs de 5 L.

4.3 Méthodologies de fermentation

4.3.1 OS3 : Stratégies de fermentation microbienne en erlenmeyers sur MSS

Les essais ont débuté par des fermentations en fioles agitées à partir des milieux semi-synthétiques spécifiques à chaque microorganisme.

Pour les souches de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*, le milieu semi-synthétique est du bouillon nutritif (BD cat 234000 sur ATCC) et dont la composition dans 1 L d'eau distillée est la suivante : 3 g d'extrait de bœuf et 5 g de peptone.

Pour la souche *Starmarella bombicola*, le milieu semi-synthétique est du bouillon de malt de levure ou Yeast Malt Broth (YM Broth BD 2711 sur ATCC) et dont la composition dans 1 L d'eau distillée est la suivante : 3 g d'extrait de levure, 3 g d'extrait de malt, 10 g de dextrose et 5 g de peptone.

Le Tableau 4-3 donne les conditions opératoires utilisées pour les tests de fermentation en fioles d'Erlenmeyer avec les différentes souches microbiennes.

Tableau 4-3 Fermentations en erlenmeyers sur MSS des souches microbiennes sélectionnées

Souches microbiennes	Inoculum			pH	Température (°C)	Vitesse d'agitation (rpm)
	Préculture 1 (PC1)	Préculture 2 (PC2)	Milieu final (MF)			
<i>Bacillus licheniformis</i>	10% PC2 (soit 5 mL dans PC2)	10% MF (soit 45 mL MSS + 5 mL PC1)	500 mL (soit 450 mL MSS + 50 mL PC2)	6,8 ± 0,2	37 °C	180
<i>Bacillus subtilis</i>				6,8 ± 0,2	30 °C	
<i>Starmarella bombicola</i>				6,2 ± 0,2	24 – 26 °C	

Le calcul des volumes d'inocula de préculture 1 (PC1) et de préculture 2 (PC2) est effectué en tenant compte de leur pourcentage dans le volume final de fermentation.

Pour les fermentations du milieu final (MF), les erlenmeyers sont incubés pendant 48 h. Pour celles des PC1 et PC2, le temps d'incubation est entre 12 et 18 h (en fonction de la sporulation pour les *Bacillus*).

L'inoculum et le milieu final contenant la souche sont cultivés en respectant les paramètres optimaux de croissance que sont le pH et la température.

La préculture 1 est préparée en inoculant dans l'erlenmeyer une colonie de la souche cultivée sur boîte de pétri gélosée.

4.3.1.1 Comptage cellulaire

Le dénombrement pour chaque souche se fait sur gélose nutritive contenant 10 g de milieu nutritif et 2% (p/v) d'agar. La solution est stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 15 min, puis coulé de manière stérile dans des boîtes de pétri sous hotte ventilée. Dans les boîtes de pétri solidifiées est étalé un volume V de 100 µL (0,1 mL) de tubes de dilutions successives obtenus à partir du bouillon de fermentation.

Les boîtes de pétri sont incubées à l'étuve à la température optimale de croissance du microorganisme et jusqu'à ce que les colonies soient visibles et reconnaissables :

- *Bacillus subtilis* : 30°C pendant 24 h.
- *Bacillus licheniformis* : 37°C pendant 24 h.
- *Starmarella bombicola* : 25°C pendant 48 à 72 h.

Des duplicatas de boîtes de pétri sont réalisés pour chaque échantillon. La concentration de l'unité formant colonie (UFC/ml) est déterminée selon la formule suivante :

Équation 4.3 Dénombrement cellulaire en UFC/mL

$$\text{UFC}_{/\text{mL}} = \frac{N}{V * F}$$

Avec N = moyenne du nombre de colonies des deux duplicatas ; V = volume prélevé (0,1 ml) ; F = facteur de dilution (de la solution mère à la dilution analysée).

4.3.1.2 Indice d'émulsification IE24

Une des mesures qualitatives des tensioactifs est la détermination de leur pouvoir émulsionnant à partir de l'indice d'émulsification. La détermination de l'indice d'émulsification notée IE₂₄ est réalisée selon le protocole suivant :

Des échantillons à différents temps de fermentation microbienne sont centrifugés à 10000 x g (9449 rpm) pendant 15 min à 4°C afin de séparer la fraction liquide contenant les surfactants des cellules plus lourdes qui se déposent au fond du tube. Dans un flacon conique de 15 mL, un volume de 4 mL de surnageant et 6 mL de kérosène sont passés au vortex pendant 2 min puis laisser reposer pendant 24 h à température

ambiante (d'où le nom IE₂₄). L'indice d'émulsion est mesuré en déterminant la hauteur de la couche émulsionnée par rapport à la hauteur totale de la colonne de liquide:

Équation 4.4 Détermination de l'Indice d'Émulsification (IE₂₄)

$$IE_{24} (\%) = \frac{\text{hauteur de la couche d'émulsion}}{\text{hauteur totale}} * 100$$

4.3.1.3 Tension de surface (TS)

La méthode généralement utilisée pour déterminer la TS est la méthode de l'anneau de "Du Nouÿ qui permet de déterminer la tension superficielle à une interface liquide-air et la tension interfaciale à une interface entre deux liquides non miscibles (Singh et al., 2019). La tension superficielle est exprimée en mN/m = dyn/cm.

Dans nos travaux, les mesures de tension de surface ont été réalisées avec la méthode de la "goutte pendante". Il s'agit de l'utilisation du FTÅ32 qui est un instrument permettant de mesurer des phénomènes tels que la tension superficielle, l'énergie de surface et l'absorption et qui est basée sur une capture vidéo rapide d'images d'une goutte et de l'analyse des images. Un volume d'échantillon contenu dans une seringue en plastique de 3 mL est analysé et avec une aiguille distribution en acier inoxydable de 0,7110 mm de diamètre.

Le FTÅ32 utilise une pompe de haute précision entraînée par un moteur pas à pas pour distribuer les gouttes en poussant sur la seringue. Dès qu'une goutte pendante est en équilibre et sans bulles, l'image est capturée par l'objectif de l'appareil photo intégré au dispositif et stockée dans la mémoire de l'appareil. L'analyse de la goutte intègre des variables telles que la densité (mesurée au préalable), le diamètre, le volume pendant et la surface qui permettent de traduire l'image à un ensemble d'équations décrivant les bords de la goutte. Il faut au préalable mesurer la densité D de l'échantillon liquide à température ambiante et effectuer la mesure de témoin avec de l'eau distillée (D = 0,999 g/cm₃ et TS = 72, 80 à 20 °C).

La Figure 4.3 suivante montre le dispositif d'analyse et l'intégration de la forme de la goutte capturée et analysée par le logiciel.

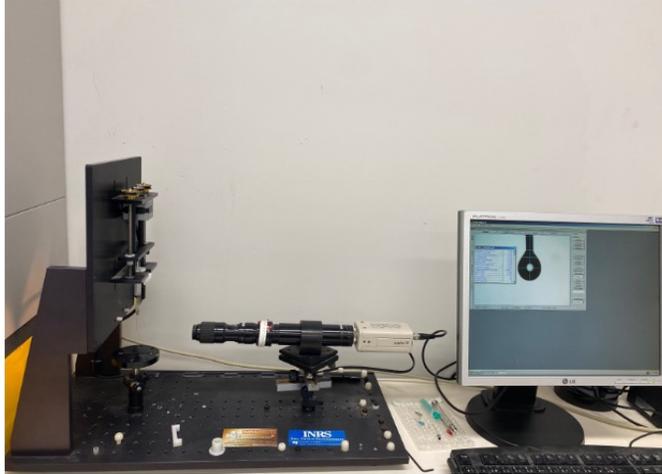


Figure 4.3 Dispositif d'analyse de la TS par la méthode de la goutte pendante

Une moyenne sur une série de trois mesures successives avec une différence $\leq 1\%$ est réalisée sur chaque échantillon. Si la différence de lecture est $> 1\%$, il faut faire une série de 12 mesures et prendre la moyenne.

4.3.1.4 Extraction des composés extracellulaires

L'extraction des composés extracellulaires permet de récupérer les métabolites secondaires produits par les microorganismes pendant leur croissance. Cette extraction est basée sur la précipitation du bouillon de culture acellulaire (surnageant de fermentation). Cette forme d'extraction n'est pas spécifique au biosurfactant et peut donc entraîner l'extraction d'autres composés. Il est ainsi souhaitable d'utiliser le terme d'extraction de composés extracellulaires plutôt que d'extraction de BS.

L'extraction de composés extracellulaires est effectuée avec de l'acide chlorhydrique (HCl) et des solvants organiques. C'est une méthode basée sur une centrifugation du bouillon de fermentation et une récupération du surnageant qui est ensuite acidifié à pH 2 par HCl 6N et précipité pendant une nuit à 4 °C. Le culot de précipitation après 24 h est ensuite récupéré par centrifugation du surnageant acidifié puis extrait avec un mélange de solvants et séché au four à 80°C jusqu'à une masse constante.

La concentration massique en composés extracellulaires produits lors de la fermentation est notée $[BS]_m$ est exprimé en g par L de bouillon de culture et est calculée avec la formule suivante :

Équation 4.5 Détermination de la concentration en BS dans le bouillon de fermentation

$$[\text{BS}]_m (\text{g/L}) = \frac{m}{V}$$

Avec m = masse de l'extrait sec ; V = volume de bouillon de culture (ou volume du surnageant).

La Figure 4.4 montre les différentes étapes d'extraction par précipitation à l'HCl et purification au solvant.



Figure 4.4 Étapes d'extraction des composés du bouillon de fermentation

Remarque : les analyses de TS et d'indice d'émulsification n'ont pas été effectuées sur les fermentations avec les MSS.

4.3.2 OS3 : Stratégies de fermentations microbiennes en erlenmeyers sur MRF

Les premiers essais de fermentations portaient sur un choix des 4 MRF (SIW, Kruger, BDS et BFW) et de trois souches microbiennes: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Starmerella bombicola*.

4.3.2.1 *Bacillus subtilis*

Un volume de 350 mL de chaque milieu (SIW, Kruger, BDS et BFW) contenant un ST de 15 g/L est stérilisé à 121°C pendant 15 ou 30 min. Un volume de 17.5 mL de bouillon nutritif représentant 5% (v/v) du volume de 350 mL est fermenté avec du *Bacillus subtilis* à 30°C pendant 12 à 15 h. Cette culture représente la PC1. À partir de cette dernière, l'inoculation du MRF final au volume de 350 mL est réalisée. La température d'incubation du MRF est de 30°C pendant 48 h.

4.3.2.2 *Bacillus licheniformis*

Un volume de 350 mL de chaque milieu (SIW, Kruger, BDS et BFW) contenant un ST de 15 g/L est stérilisé à 121°C pendant 15 ou 30 min. Un volume de 17.5 mL de bouillon nutritif représentant 5% (v/v) du volume de 350 mL est fermenté avec du *Bacillus licheniformis* à 37 °C pendant 12 à 15 h. Cette culture représente

la PC1. À partir de cette dernière, l'inoculation du MRF final au volume de 350 mL est réalisée. La température d'incubation du MRF est de 37°C pendant 48 h.

4.3.2.3 *Starmerella bombicola*

Un volume de 350 mL de chaque milieu (SIW, Kruger, BDS et BFW) contenant un ST de 15 g/L est stérilisé à 121°C pendant 15 ou 30 min. Un volume de 17.5 mL de bouillon nutritif représentant 5% (v/v) du volume de 350 mL est fermenté avec du *Starmerella bombicola* à 25°C pendant 12 à 15 h. Cette culture représente la PC1. À partir de cette dernière, l'inoculation du MRF final au volume de 350 mL est réalisée. La température d'incubation du MRF est de 25°C pendant 48 h.

Ci-après un tableau récapitulatif (Tableau 4-4) des fermentations sur MRF des différentes souches et les paramètres opératoires.

Tableau 4-4 Tableau récapitulatif des différentes fermentations en erlenmeyers effectuées sur MRF et les analyses

Souches microbiennes / Température de fermentation (°C)	MRF				ST MRF (g/L)	Volume MF de MRF (mL)	Inoculum (%) PC1 (avec MSS)	Inoculum (mL) PC1	Analyses effectuées			
	SIW	Kruger	BDS	BFW					Compte cellulaire	Extraction BS	IE ₂₄	TS
<i>Bacillus subtilis</i> 30°C	✓	✓	✓	✓	15	350	5	17,5	✓	✓	X	X
<i>Bacillus licheniformis</i> 37°C	X	X	X	X	-	-			X	X	X	X
<i>Starmerella bombicola</i> 25°C	✓	✓	✓	✓	15	350			✓	✓	X	✓

✓ : fermentations et/ou analyses effectuées

X : fermentations et/ou analyses non effectuées.

La Figure 4.5 suivante illustre les tests de fermentation effectués avec la première sélectionnée de MRF dans un incubateur à agitation rotative à 180 rpm de la souche *Bacillus subtilis*.



Figure 4.5 Exemple de fermentation en erlenmeyers avec *Bacillus subtilis*

4.3.3 OS4 : Optimisation des fermentations en erlenmeyers

L'optimisation des fermentations en fioles agitées est réalisée en fixant des variables d'entrée et de sortie. Le logiciel de plan d'expérience Design-Expert® 2 avec la fonction Box Benhken est utilisé. C'est un plan d'expérience centré pour le même nombre de facteurs avec 3 niveaux pour chacun d'eux : -1, 0 et +1 pour assurer la condition d'orthogonalité. Les erreurs de prédiction sont plus faibles que celles expérimentales.

Il s'agira pour ces expériences de fixer les niveaux hauts, bas et centrés de :

Trois facteurs qui sont les variables d'entrée : concentration en ST dans le MRF de départ: 15; 20 et 25 g/L, le pourcentage d'inoculum : 2,0 ; 3,5 et 5,0% et la température de croissance dépendamment de chaque souche microbienne. La température optimale de chaque microorganisme est encadrée avec une valeur minimale et une valeur maximale sur les trois niveaux. Le pH optimal de chaque souche est celui mentionné dans la fiche ATCC (Tableau 4-3).

Les réponses suivantes constituent les variables de sorties : la quantité d'extrait en g/L sur 0 h, 24 h, 48 h et 72 h. De plus, une analyse qualitative de la production de composés extracellulaires à savoir l'indice

d'émulsification IE₂₄ est effectuée sur tous les échantillonnages de 0, 24, 48 et 72 h afin de pouvoir évaluer le caractère émulsionnant des milieux fermentés.

17 expérimentations combinant les 3 variables d'entrée avec des points centrés sont à tester.

Pour ces expérimentations en fioles agitées, *Starmerella bombicola* et *Bacillus subtilis* sont cultivées à partir du milieu SIW alors que *Bacillus licheniformis* est fermenté à partir du milieu Kruger.

L'utilisation du plan d'expérience (DOE) avec Box Benhken permet, pour cette partie, de pouvoir uniquement fixer les différentes valeurs des variables d'entrée à tester; l'exploitation des résultats sera basée sur les données d'IE₂₄ et l'évolution des quantités d'extraits obtenues au cours de la fermentation.

Le Tableau 4-5, Tableau 4-6 et Tableau 4-7 donnent les conditions testées lors des essais préparés par la méthodologie de Box Benhken avec chaque souche et son milieu.

Tableau 4-5 Plan d'expérience de la fermentation de *Starmerella bombicola* avec le milieu de culture SIW

Run	Factor A ST (g/L)	Factor B Inoculum (%)	Factor C Température (°C)
1	25	5	20
2	20	2	25
3	20	5	25
4	15	2	20
5	15	5	20
6	20	3.5	25
7	25	2	30
8	20	3.5	30
9	15	2	30
10	15	5	30
11	15	3.5	25
12	25	3.5	25
13	20	3.5	25
14	25	2	20
15	20	3.5	25
16	20	3.5	20
17	25	5	30

Tableau 4-6 Plan d'expérience de la fermentation de *Bacillus subtilis* avec le milieu de culture**SIW**

Run	Factor A ST (g/L)	Factor B Inoculum (%)	Factor C Température (°C)
1	15	3.5	23
2	20	3.5	30
3	15	3.5	37
4	25	3.5	23
5	20	3.5	30
6	25	3.5	37
7	15	5	30
8	20	5	37
9	20	2	37
10	15	2	30
11	25	2	30
12	25	5	30
13	20	2	23
14	20	5	23
15	20	3.5	30
16	20	3.5	30
17	20	3.5	30

Tableau 4-7 Plan d'expérience de la fermentation de *Bacillus licheniformis* avec le milieu de culture SIW

Run	Factor A ST (g/L)	Factor B Inoculum (%)	Factor C Température (°C)
1	20	3.5	37
2	15	2	37
3	15	3.5	41
4	25	2	37
5	20	3.5	37
6	25	3.5	41
7	20	3.5	37
8	25	3.5	33
9	20	2	41
10	20	3.5	37
11	20	5	41
12	15	5	37
13	20	3.5	37
14	20	5	33
15	15	3.5	33
16	20	2	33
17	25	5	37

La Figure 4.6 montre des flacons de fermentations par plan d'expérience de *Bacillus subtilis* incubés sur un agitateur rotatif à 30°C.



Figure 4.6 Fermentation en bioréacteurs : souche – MRF et paramètres

Les analyses effectuées pour ces fermentations sont les paramètres des variables de sortie : l'extraction de composés et l'IE₂₄ telles que décrites dans l'objectif spécifique 3 respectivement en 4.3.1.4 et en 4.3.1.2.

4.3.4 OS5 : Fermentations en bioréacteurs de 5 litres

Les fermentations en bioréacteurs permettent de contrôler les paramètres abiotiques (pH, température, agitation, aération, etc.) et biotiques (apport en nutriments) qui ont un impact direct sur la performance des microorganismes. L'optimisation réalisée en fioles agitées a permis de sélectionner les paramètres optimaux de croissance cellulaire et de production d'extrait pour chaque microorganisme en fonction du MRF spécifique. Ici, les fermentations en bioréacteurs sont effectuées en batch; donc sans apport de nutriments durant la fermentation. Le ratio carbone/azote est de 9:1 pour les milieux SIW et Kruger (Tableau 8-13). La figure suivante (Figure 4.7) donne les paramètres de base (température, pourcentage d'inoculum et concentration en solides totaux) qui sont fixés pour tous les essais de fermentations en bioréacteurs de 5 L pendant 72 h.

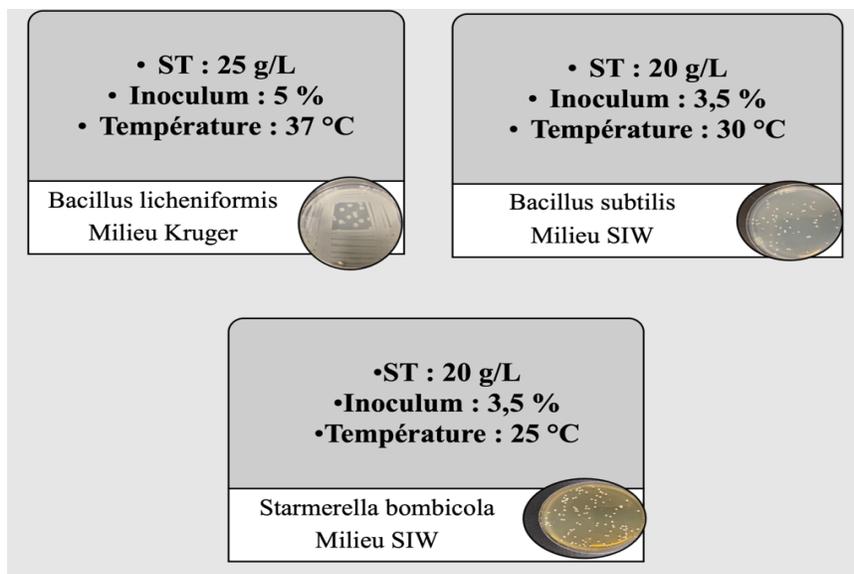


Figure 4.7 Fermentation en bioréacteurs : souche – MRF et paramètres

La fermentation est réalisée en mode batch dans les bioréacteurs et se déroulent comme suit:

En bioréacteur de 5 L, le volume utile de travail est de 3,5 L. Des échantillonnages sont effectués à chaque 3 h pour les premières 12 h de fermentation puis à chaque 6 ou 12 h jusqu'à la fin de la fermentation. L'oxygène dissout est maintenu entre 30 et 50% en ajustant la vitesse d'agitation et le taux d'aération tout au long de la fermentation. Le pH optimal est maintenu et ajusté automatiquement par le système en pompant de l'hydroxyde de sodium 4N ou de l'acide sulfurique 4N. Les paramètres à fixer et/ou à surveiller pendant la fermentation sont la vitesse d'agitation (en rpm), l'aération (en L/min), le pH, l'oxygène dissout (OD en%) et la formation de mousse. L'apparition de mousse est due à l'agitation et à l'aération dans le bioréacteur, elle est contrôlée par ajout d'antimousse

Le suivi analytique de la fermentation s'effectue par le dénombrement cellulaire, l'extraction des composés extracellulaires et la concentration du surnageant de fermentation avec l'utilisation de membrane de concentration à échelle laboratoire: 1K (1000 g/mol) et 2K ((2000 g/mol) dépendamment du poids moléculaire des molécules de surfactants microbiens recherchées, la détermination des tensions interfaciales, des indices d'émulsification et de la composition moléculaire sur surnageants bruts et concentrés.

La concentration du surnageant à partir des membranes 1K et 2K permet d'étudier l'effet de la séparation membranaire et des tailles des membranes sur la concentration des biosurfactants à travers l'analyse des IFT et IE₂₄.

La concentration des surnageants bruts est effectuée en utilisant différentes membranes dépendamment du poids moléculaire des BS recherchés. Pour les lipopeptides de Bacillus dont le poids moléculaire (Surfactines par exemple) est de 1036,3 g/mol, la membrane 2K est utilisée; pour les sophorolipides de Starmerella dont le poids moléculaire est compris entre 500 et 1500 g/mol, les membranes 1K et 2K sont utilisées. Pour le principe de concentration, se référer à l'annexe 0.

La figure suivante (Figure 4.8) illustre schématiquement la fermentation en bioréacteurs de 5 litres et les analyses qui sont faites sur les produits de la fermentation.

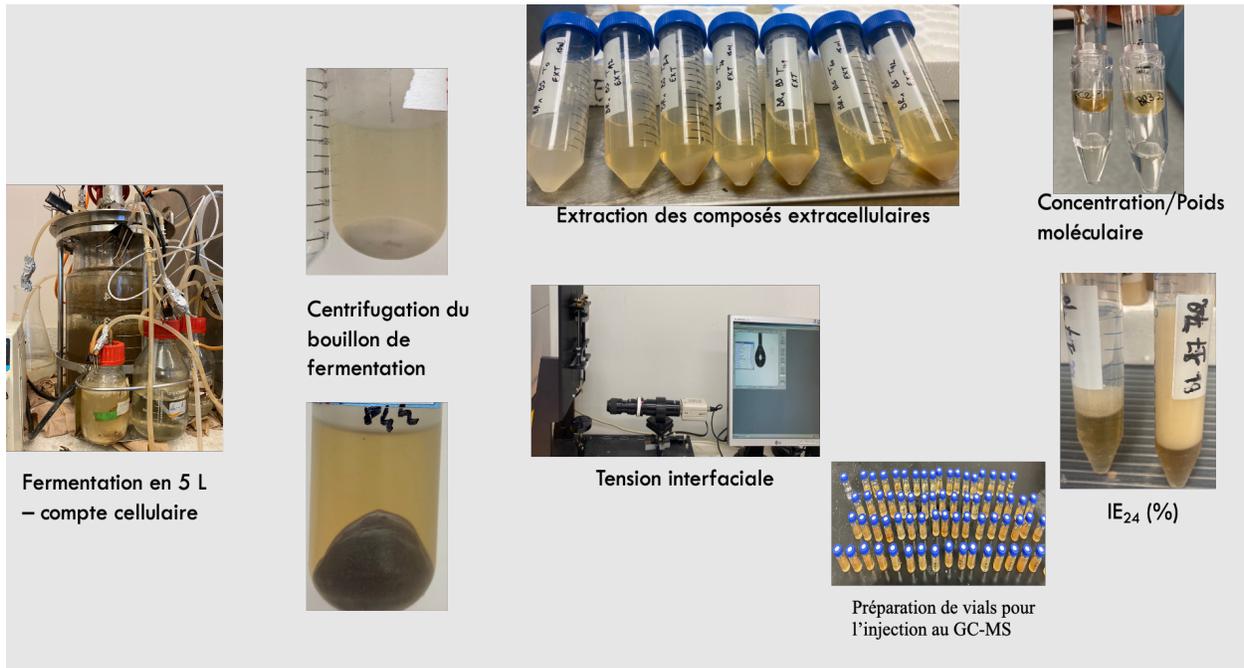


Figure 4.8 Fermentation en bioréacteurs de 5 L – Analyses physico-chimiques

Deux essais de fermentation de 72 h ont été réalisés avec des volumes de 3,5 L dans les bioréacteurs de 5 L pour chacune des trois souches bactériennes. Les conditions spécifiques à chaque essai sont décrites au Tableau 4-8.

Tableau 4-8 Conditions de fermentations en bioréacteurs de 5 L

Souches	SIW (g/L)	Inoculum (%)	Temp. (°C)	Anti-mousse	pH
<i>Starmarella bombicola</i>	20	3,5	25	-	6,2 Non ajusté
<i>Bacillus subtilis</i>	20	3,5	30	+	7,0 Non ajusté
<i>Bacillus licheniformis</i>	25	5,0	37	+	7,0 Non ajusté

Le suivi de pH (pH non ajusté à une valeur optimale) permettrait de pouvoir suivre les variations de pH dans le fermentateur et de voir les effets que cela pourrait avoir sur la croissance cellulaire et/ou sur la production d'extraits cellulaires.

4.3.5 OS6 : Caractérisation des BS (confère Annexe 8.8)

5 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

5.1 Sélection des MRF

Le Tableau 5-1 présente les résultats des analyses de base effectuées sur tous les MRF. Les analyses physico-chimiques réalisées sur les MRF sont un critère primordial de validation du choix des MRF. La nature et la forme complexe des sources organiques des MRF représentent très souvent un frein à la fermentation microbienne. Toutefois, la présence de sucres réducteurs dans les différents MRF analysés et principalement dans le SIW témoigne de la capacité de ces milieux à supporter la croissance des microorganismes et la production de métabolites.

Par ailleurs, le solide total a été choisi comme un paramètre de base de la fermentation des microorganismes. Tous les MRF étudiés ont été concentrés (SIW, Kruger, BDS) ou dilués (BFW) pour atteindre une concentration initiale en solide total de 15 g/L au début de la fermentation. En effet, le solide total renferme les nutriments organiques complexes (carbone et azote) ou simples (sucres réducteurs) et les microéléments nécessaires à la production de protéines cellulaires et de métabolites. En termes de sélection des MRF, la concentration de 15 g/L agit comme un “rule of thumb” (une règle de base) que nous nous sommes fixés avant une optimisation. Cette concentration est suffisante pour contenir les nutriments nécessaires à la croissance cellulaire.

Ainsi, le milieu « Filtration » des eaux de brasseries n’a pas été retenu pour la suite du travail, car il ne présentait pas suffisamment de nutriments, d’où sa faible concentration en solides totaux de 1,6 g/L.

Enfin, les eaux résiduelles de brasserie (BFW et BDS) n’ont pas donné des résultats prometteurs dans les fermentations tests comparativement aux résultats de fermentation issus du SIW et de Kruger. La croissance cellulaire négligeable et la faible production de biosurfactant observée dans les MRF de brasserie seraient dues aux résidus d’alcool nocifs aux cellules bactériennes.

Tableau 5-1 Analyses physico-chimiques des MRF

MRF	Désignations	pH	ST (g/L)	MES (g/L)	Concentration (g/L)						
					Glucose	Fructose	Lactose	Sucrose	Galactose	Xylose	Tréhalose
Eaux usées d'industries d'amidon	Starch industrial wastewater (SIW)	3,99	13,2	4,4	31,9	11,4	9,1	6,4	8,7	7,6	5,7
Boues activées de l'usine de pâtes et papiers Kruger	Kruger	6,65	10,3	9,4	1,9	1,5	0,83	0,97	1,4	1,1	0,53
Eaux usées d'industries de brasserie	Filtration	5,62	1,6	1,1	0,12	0,025	0,005	0,015	0,025	0,005	0,005
	Brewery fermentation wastewater (BFW)	5,33	69,0	13,5	0,96	0,38	0,65	0,15	0,3	0,7	1,3
	Brewery distillation sludge (BDS)	5,62	12,0	5,6	16,7	15,0	8,3	8,3	14,3	9,5	8,3

5.2 Stratégies de fermentation microbienne en fioles agitées avec MRF

Les résultats des fermentations de *Starmerella bombicola* et *Bacillus subtilis* en fioles agitées à partir des MRF suivants : SIW, Kruger, BDS et BFW sont discutés ci-dessous.

5.2.1 *Starmerella bombicola* ATCC 22214

Pour les premières fermentations en fioles agitées de *Starmerella bombicola*, le suivi de croissance cellulaire et la mesure des TS ainsi que les extractions de composés extracellulaires ont été réalisés.

Le Tableau 5-2 et la Figure 5.1 présentent la culture de *Starmerella bombicola* dans les MRF : SIW, Kruger, BFW et BDS pendant 48 h avec un inoculum de 5% (v/v). Les résultats de croissance cellulaire montrent que le milieu SIW, BFW et BDS sont capables de supporter la croissance cellulaire. En effet, ces derniers montrent un \log_{10} (CFU/mL) constamment en évolution de 0 à 48 h pour le SIW passant de 7,68 à 8,82, pour BFW de 7,50 à 9,14 et pour BDS de 7,61 à 9,13. Dans les MSS, le \log_{10} (CFU/mL) de la croissance de *Starmerella bombicola* est de 9,19 et 9,16 respectivement à 24 et 48 h de fermentations (Annexe 0). Le MSS (bouillon de malt de levure) est le milieu de croissance optimal de la levure *Starmerella bombicola*, mais en comparaison à ces résultats de fermentation, tous ces MRF supportent la croissance cellulaire avec BDS et BFW se rapprochant plus de la croissance en fin de fermentation avec MSS.

Il est à noter l'évolution du pH lors de la fermentation dans les fioles agitées du BFW et du BDS qui s'acidifient progressivement jusqu'à atteindre un pH 4. Par ailleurs, les boues secondaires de Kruger n'ont pas présenté de croissance pour la souche *Starmerella bombicola*. Ces résultats correspondent à l'attente qui s'était faite en constatant les résultats de caractérisation des sucres réducteurs. Il semble que les milieux SIW et BFW contiennent plus de nutriments facilement assimilables pour la culture cellulaire.

Tableau 5-2 Profil de croissance cellulaire de *Starmerella bombicola* en fioles agitées

Temps de fermentation (h)	SIW 5%		Kruger 5%		BFW 5%		BDS 5%	
	Log10 (CFU/mL)	pH lu						
0	7,68	5,93	7,59	7,08	7,50	6,22	7,61	6,04
3	7,72	5,87	7,54	6,87	7,57	6,22	7,63	5,79
6	8,19	5,31	7,76	7,01	7,96	6,04	7,90	5,71
9	8,37	5,28	7,68	7,03	7,59	6,00	8,08	5,59
12	7,96	5,19	7,83	6,93	7,57	5,67	7,94	5,32
22	8,67	5,89	7,66	7,05	8,33	4,98	8,21	5,12
24	8,94	6,30	7,87	7,42	8,91	4,85	8,95	4,93
48	8,82	6,36	7,54	7,09	9,14	4,79	9,13	5,74

La Figure 5.1 donne les courbes de croissance et de suivi de pH de *Starmerella bombicola* avec les différents MRF pendant les 48 h de fermentation.

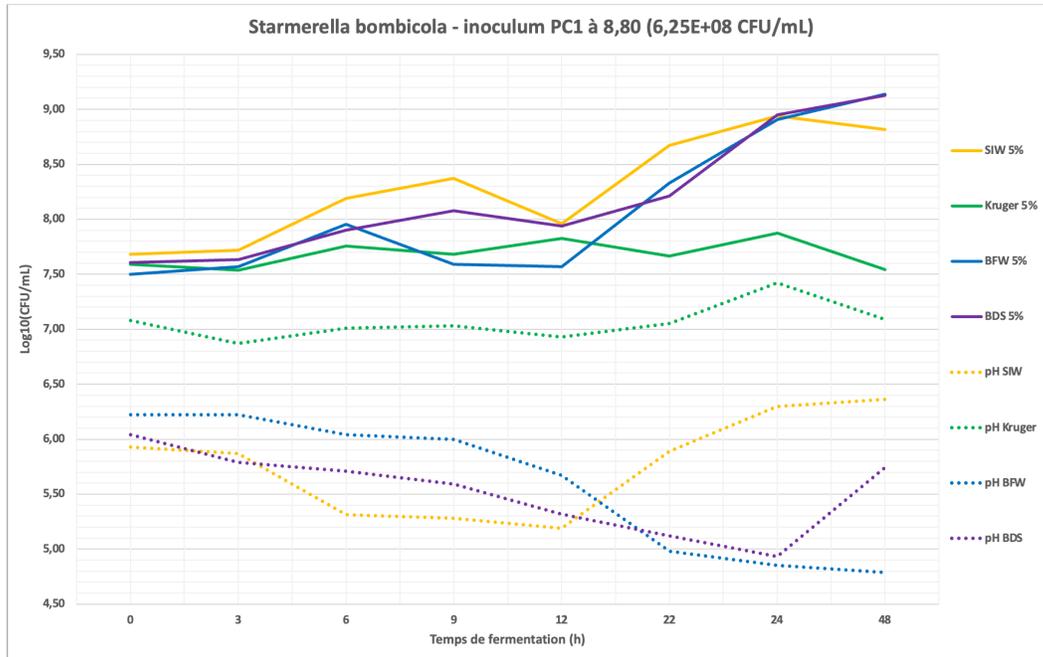


Figure 5.1 Courbes de croissance et de pH de la levure *Starmerella bombicola* avec SIW, Kruger, BFW et BDS. Traits pleins : courbes de croissance; Traits en pointillés : courbes de variation de pH

Le Tableau 5-3 présente les valeurs de tension de surface obtenues après fermentation de 24 et 48 h dans les différents MRF pour la souche *Starmerella bombicola*.

Ces résultats suivent la tendance des résultats de fermentation cellulaire. En effet, les échantillons pour lesquels la tension de surface est nettement plus faible que celle de l'eau (72,80 dyn/cm) sont les échantillons SIW et encore plus celui du BDS à 48 h présentant une valeur de 44,08 dyn/cm. Ces valeurs témoignent de la production de biosurfactant par la souche *Starmerella bombicola* lors de sa croissance dans le milieu SIW et BDS. La faible croissance cellulaire de *Starmerella bombicola* notée dans le MRF Kruger associée à sa faible réduction de tension de surface permet d'indiquer qu'une concentration en microorganismes plus importante implique une meilleure réduction de la TS par rapport à celle de l'eau.

Cependant notons que la réduction de la TS dans un milieu n'est exclusivement pas fonction de la présence et/ou de la concentration en BS puisque l'abaissement de la TS est une propriété de la matière qui se traduit par l'adsorption de molécules solubles ou insolubles à l'interface de deux phases (Rieger, 2020).

Les données d'extraction peuvent appuyer la présence de BS aux propriétés tensioactives.

Le Tableau 5-4 présente les résultats issus des extractions de composés extracellulaires (biosurfactants et autres débris). Les extractions réalisées sur MSS sont considérées comme les témoins et donnent respectivement des résultats de 1,11 et 1,72 g/L à 24 et 48 h. Ces extraits sont dans l'ensemble plus importants que ceux mesurés à partir des MRF; ce qui peut être dû au fait que le MSS est le milieu de croissance optimal de *Starmerella bombicola* et qu'une meilleure croissance cellulaire et une meilleure production de métabolites secondaires y sont observées.

Pour les milieux Kruger et BDS, beaucoup de résidus étaient présents dans le surnageant après la centrifugation du bouillon de culture; résidus qui se retrouvent dans le culot de précipitation et qui influent ainsi dans le calcul de la masse extraite. Afin de corriger les résultats dus à la présence des résidus sur les expériences suivantes, les extraits ont été réalisés à partir des MRF en condition de fermentation, mais sans inoculation (témoin); en enlevant ainsi des résultats la part de résidus présents dans le surnageant brut.

Tableau 5-3 Mesures de TS pour *Starmerella bombicola* en fioles agitées

MRF	TS (dyn/cm ou mN/m)	
	24 h	48 h
SIW 5%	54,97	56,28
Kruger 5%	66,30	60,90
BFW 5%	52,35	52,81
BDS 5%	50,62	44,08

Tableau 5-4 Concentration en extraits de BS pour *Starmerella bombicola* en erlenmeyers

MRF	Composés extracellulaires (g/L de bouillon de culture)	
	24 h	48 h
SIW 5%	0,334	0,585
Kruger 5%	0,470	0,520
BFW 5%	0,185	0,075
BDS 5%	1,660	1,490
MSS	1,110	1,720

5.2.2 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Pour les premières fermentations en erlenmeyers de *Bacillus subtilis*, le suivi de croissance cellulaire ainsi que les extractions de composés extracellulaires ont été réalisés. Le Tableau 5-5 présente les données de suivi de croissance et de pH pour la fermentation de *Bacillus subtilis* à partir des quatre MRF sélectionnés.

Le Tableau 5-5 et la Figure 5.2 présentent la culture de *Bacillus subtilis* dans les MRF : SIW, Kruger, BFW et BDS pendant 48 h avec un inoculum de 5% (v/v).

Les données de dénombrement cellulaire montrent que la bactérie *Bacillus subtilis* est capable de croître efficacement dans les milieux SIW et Kruger. En effet après inoculation, le \log_{10} (CFU/mL) de la population bactérienne passe de 5,24 à 7,42 et de 5,30 à 8,59 respectivement pour SIW et Kruger, de 0 à 48 h de fermentation. Les milieux BDS et BFW n'ont pas démontré une croissance cellulaire de *Bacillus subtilis*, ce qui pourrait être notamment dû à la présence de résidus d'alcool nocifs aux cellules bactériennes.

Lors de ces fermentations en erlenmeyers, le pH est resté constant pour tous les milieux sur les 48 h, autour de la neutralité et du pH optimal de *Bacillus subtilis* (pH 7) avec un minimum de 6,19 observé dans le milieu SIW à T9 et un maximum de 7,82 observé dans le milieu Kruger à T0. Il n'y a donc pas eu d'acidification ni d'alcalinisation des milieux pendant la fermentation et pouvant impacter sur la croissance cellulaire.

Ces croissances observées avec *Bacillus subtilis* confirment la présence de nutriments facilement assimilables dans les milieux SIW et Kruger.

Tableau 5-5 Profil de croissance cellulaire de *Bacillus subtilis* en fioles agitées

Temps de fermentation (h)	SIW 5%		Kruger 5%		BFW 5%		BFW 5%	
	log10 (CFU/mL)	pH lu						
0	5,24	6,89	5,30	7,82	2,85	6,88	3,95	6,95
3	-	-	-	-	2,47	6,89	2,98	6,98
6	6,47	6,75	5,40	7,47	2,81	6,91	3,00	6,98
9	6,19	6,63	4,11	7,28	1,78	6,90	3,23	6,97
12	6,42	6,79	4,49	7,23	1,65	6,90	3,04	6,97
22	-	-	-	-	4,26	6,84	4,45	6,89
24	6,48	6,80	7,39	7,26	3,45	6,88	2,91	6,94
32	6,69	6,80	7,79	7,49	-	-	-	-
48	7,42	7,14	8,59	7,67	2,16	6,83	2,82	6,89

Les courbes de croissance et de pH sont données à la Figure 5.2:

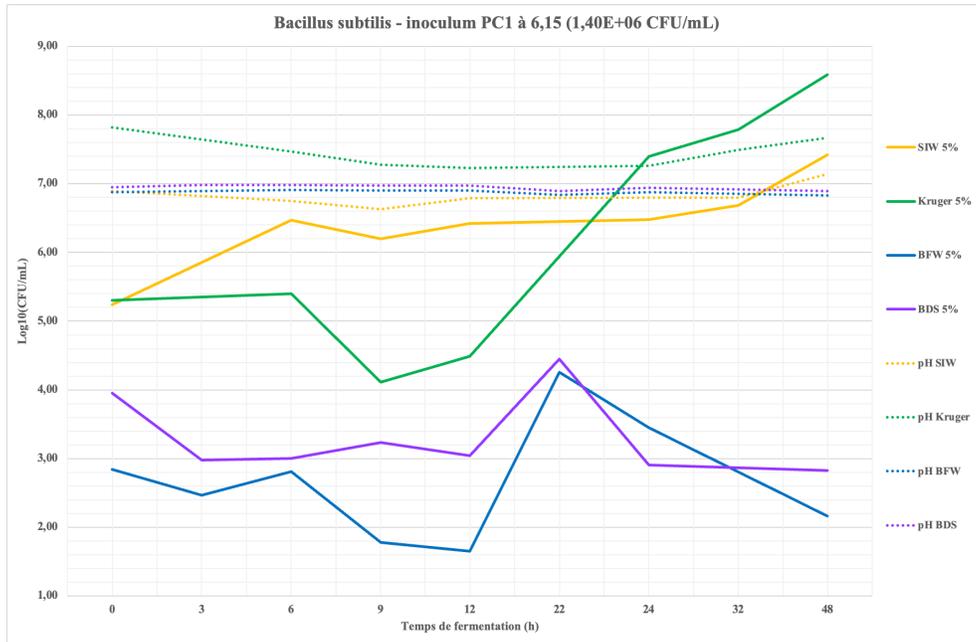


Figure 5.2 Courbes de croissance de *Bacillus subtilis* avec les milieux SIW, Kruger, BDS et BFW

Le Tableau 5-6 présente les résultats issus des extractions de composés extracellulaires (biosurfactants et autres débris). Pour le milieu BDS, la présence de résidus dans le surnageant après la centrifugation du bouillon de culture était notée ; résidus qui se retrouvent dans le culot de précipitation et qui influent ainsi dans le calcul de la masse extraite. Les résultats de l'extraction du surnageant de fermentation avec BFW et BDS suivent ceux de la croissance cellulaire qui baisse entre 24 et 48 h de fermentation. Les extraits dans le milieu Kruger sont plus importants comme pour sa croissance cellulaire entre 24 et 48 h; par rapport à SIW. Cependant, entre 24 et 48 h, les composés extracellulaires dans le SIW augmentent de 30%, contre 18% dans le milieu Kruger. En effet, *Bacillus subtilis* produit des lipopeptides par fermentation dans les milieux résiduels d'amidon (ici SIW) tel que démontre par (Nitschke et al., 2004) où la fermentation avec des eaux résiduelles de farine de manioc (Manipueira) a permis d'obtenir une concentration en surfactine de 2 g/L en 72 h.

Tableau 5-6 Concentration en extraits de BS pour *Bacillus subtilis* en erlenmeyers

MRF	Composés extracellulaires (g/L de bouillon de culture)	
	24 h	48 h
SIW 5%	0,68	0,67
Kruger 5%	0,61	0,23
BFW 5%	0,32	0,26
BDS 5%	0,75	0,27

5.3 Optimisation des fermentations microbiennes en fioles agitées

Les résultats préliminaires de croissance cellulaire sur les différents milieux résiduels fermentescibles montrent des affinités entre certains MRF et des microorganismes. La levure *Starmerella bombicola* et la bactérie *Bacillus subtilis* se multiplient et produisent des biosurfactants en quantité satisfaisante dans le MRF SIW, alors que *Bacillus licheniformis* a une préférence pour le milieu Kruger (Annexe Figure 8.3). Ainsi, une série de 17 fermentations en fioles agitées a été réalisée pour chacune des souches en fonction de son MRF sélectionné. L'optimisation des paramètres tels que le solide total, l'inoculum et la température a été réalisée en fonction des extraits extracellulaires obtenus et de l'indice d'émulsification.

5.3.1 *Starmerella bombicola* ATCC 22214

Le Tableau 5-7 présente les résultats des extraits à partir des 17 séries de fermentations en fioles agitées. Comme décrit plus haut, les extraits composés de biosurfactant peuvent être accompagnés de débris provenant en majorité du MRF. Ainsi, une extraction a été réalisée sur tous les MRF en condition de fermentation, mais sans inoculation. Les résultats obtenus sont présentés dans la case extrait_0 h. Ils sont utilisés comme base comparative par rapport aux extraits à 24, 48 et 72 h et permettent de corriger les résultats obtenus.

Ces résultats ne permettent pas de donner un temps de fermentation pour lequel un haut rendement en biosurfactant est obtenu. Selon les conditions de fermentation, une forte concentration en biosurfactant peut être obtenue entre 24, 48 et 72 h. Toutefois, la Figure 5.3 présente des pics importants pour les essais 7 et 14 à 48 h de fermentation. Ces deux résultats indiquent que la levure *Starmerella bombicola* produit des biosurfactants sur une large gamme de température (entre 20 et 30°C) et à un taux d'inoculum de 2% (v/v). Toutefois à 72 h de fermentation, la concentration en BS diminue considérablement avec ces expériences, contrairement aux essais 3, 6, 13, 15 et 16 où la quantité d'extraits augmentent en fonction du temps de fermentation avec une valeur du témoin (extrait_0H quasi constant pour toutes ces expériences). La diminution des extraits à 72 h peut être due à l'utilisation par la levure des nutriments présents dans ces

composés extracellulaires, pour sa croissance cellulaire. La température de 25°C peut être considérée avec ces expérimentations.

L'indice d'émulsification IE₂₄ présenté dans le tableau (Tableau 5-8) suit également la même tendance d'évolution avec des pics dans la quantité des biosurfactants produits en ces des périodes (essais 3, 6, 13, 15 et 16). Toutefois, aux essais 3 et 16, l'IE₂₄ obtenu à T72 est faible contrairement aux autres. Les expérimentations aux essais 7 et 14 donnent les IE₂₄ les plus élevés à 48 h, mais ils baissent considérablement à 72 h (voir nul pour l'essai 7). La valeur maximale de 58 % montre une bonne émulsion comparativement aux IE₂₄ des surfactants classiques les plus efficaces du marché (Annexe 8.9).

La combinaison de tous ces paramètres donnait les conditions présentées dans les essais 6, 13 et 15 pour la mise à l'échelle en bioréacteur de 5 L de la culture de *Starmerella bombicola* à partir du SIW avec un ST de 20 g/L, un pourcentage d'inoculum de 3,5% et une température de 25°C.

Tableau 5-7 Concentrations de BS (g/L) mesurées sous différentes conditions de fermentation de *Starmerella bombicola*

Run	Variables d'entrée			Réponses			
	ST (g/L)	Inoculum (%)	Température (°C)	Extrait_0 h (g/L)	Extrait_24 h (g/L)	Extrait_48 h (g/L)	Extrait_72 h (g/L)
1	25	5	20	4,150	8,110	8,105	7,293
2	20	2	25	2,303	4,965	4,730	3,635
3	20	5	25	2,070	4,533	5,385	6,415
4	15	2	20	2,440	3,418	6,620	5,920
5	15	5	20	2,008	2,963	5,686	4,398
6	20	3.5	25	2,213	4,868	4,180	9,943
7	25	2	30	4,093	7,043	11,380	1,745
8	20	3.5	30	2,355	5,578	0,795	1,868
9	15	2	30	0,625	3,703	2,088	1,170
10	15	5	30	2,040	3,093	3,988	3,123
11	15	3.5	25	2,368	5,265	1,825	1,418
12	25	3.5	25	3,048	6,745	6,500	1,733
13	20	3.5	25	2,163	4,835	5,575	7,120
14	25	2	20	3,318	8,700	10,723	7,848
15	20	3.5	25	2,023	3,583	5,843	8,865
16	20	3.5	20	2,040	4,465	4,935	6,598
17	25	5	30	2,983	7,135	1,093	1,283

Les extractions sont visualisées avec les histogrammes en barres de la Figure 5.3.

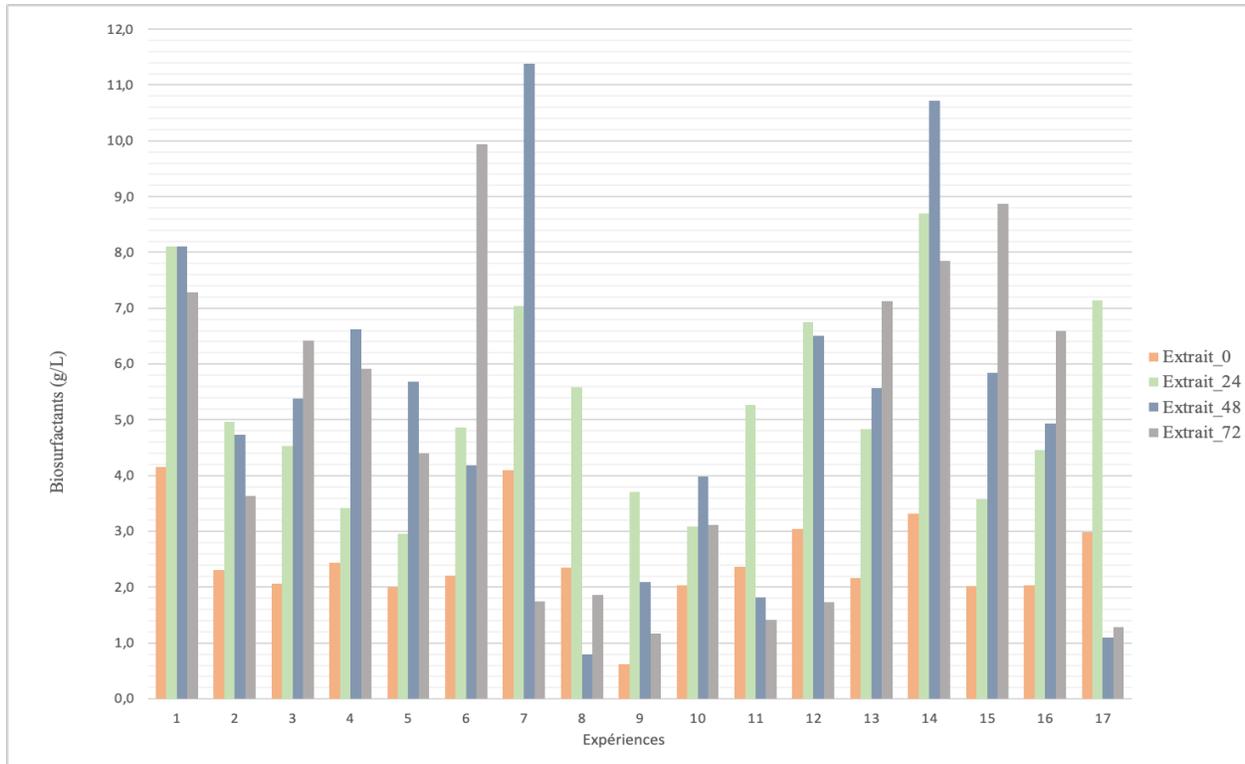


Figure 5.3 Concentrations (g/L) des BS pour le plan d'expérience de *Starmerella bombicola* - *SIW*

Tableau 5-8 Indices d'émulsification IE₂₄ mesurés sous différentes conditions de fermentation par *Starmerella bombicola*

Run	Variables d'entrée			Réponses			
	ST (g/L)	Inoculum (%)	Température (°C)	IE ₂₄ (%) 0 h	IE ₂₄ (%) 24 h	IE ₂₄ (%) 48 h	IE ₂₄ (%) 72 h
1	25	5	20	5	30	30	24
2	20	2	25	0	20	19	10
3	20	5	25	0	8	8	20
4	15	2	20	0	3	15	11
5	15	5	20	0	3	13	21
6	20	3.5	25	0	24	18	62
7	25	2	30	0	15	83	0
8	20	3.5	30	0	11	0	0
9	15	2	30	0	5	0	0
10	15	5	30	0	0	7	0
11	15	3.5	25	0	8	0	0
12	25	3.5	25	0	15	15	0
13	20	3.5	25	0	25	25	50
14	25	2	20	0	50	70	47
15	20	3.5	25	0	15	25	58
16	20	3.5	20	0	15	15	30
17	25	5	30	0	32	0	0

5.3.2 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Le Tableau 5-9 présente les résultats des extraits à partir des 17 séries de fermentations en erlenmeyers de *Bacillus subtilis*. Les extractions ont été réalisées sur tous les MRF en condition de fermentation (à T24, T48 et T72) et sans inoculation (à T0). Les résultats obtenus des extraits_0h sont utilisés comme base comparative par rapport aux extraits à 24, 48 et 72 h et permettent de corriger les résultats obtenus. Les concentrations des extraits contenant du BS et d'autres composés (notamment du MRF transféré dans le surnageant) sont très importantes pour les fermentations effectuées à une température de 30°C (essais 2, 5, 11, 12, 15, 16 et 17). Selon les conditions de fermentation, une forte concentration en biosurfactant peut être obtenue entre 24 et 72 h. La Figure 5.4 présente un pic important à 72 h de fermentation pour l'essai 2 et des pics moyens pour 15, 16 et 17. Les extraits à 48 h sont dans l'ensemble relativement faibles par rapport au témoin T0 et à T24.

Ces deux résultats indiquent que pour la bactérie *Bacillus subtilis*, la température optimale de croissance est de 30°C. La production des biosurfactants y est importante avec taux d'inoculum de 3,5% (v/v) et une concentration en solides totaux de 20 g/L.

Le tableau d'indice d'émulsification IE₂₄ (Tableau 5-10) donne une valeur maximale à 72 h pour l'essai 2. Cette valeur maximale de 60 % s'apparente à celle à l'IE₂₄ du sel de sodium de surfactine brute (Annexe 8.9) dont la valeur est de 68 %.

Les duplicatas de ce point centré (essais 5, 15, 16 et 17) ont des indices beaucoup plus bas ; notons que la détermination de IE₂₄ est une mesure qualitative permettant d'évaluer la présence et le caractère émulsionnant d'un BS, mais qui quantitativement n'évalue pas sa concentration.

La combinaison des extraits et des IE₂₄ donne les paramètres optimaux suivants pour la mise à l'échelle en bioréacteur de 5 L de la culture de *Bacillus subtilis* à partir du SIW : ST de 20 g/L, % inoculum de 3,5 et température de 30°C.

Tableau 5-9 Concentrations en extraits de BS (g/L) mesurées sous différentes conditions de fermentation par *Bacillus subtilis*

Run	Variables d'entrée			Réponses			
	ST (g/L)	Inoculum (%)	Température (°C)	Extrait_0 h (g/L)	Extrait_24 h (g/L)	Extrait_48 h (g/L)	Extrait_72 h (g/L)
1	15	3.5	23	0,320	0,567	0,527	0,525
2	20	3.5	30	0,750	2,685	0,990	4,438
3	15	3.5	37	0,338	0,535	0,375	0,267
4	25	3.5	23	1,153	0,930	0,627	0,848
5	20	3.5	30	1,010	2,440	1,180	2,830
6	25	3.5	37	0,483	0,560	0,303	1,338
7	15	5	30	0,332	1,893	0,662	1,955
8	20	5	37	0,678	0,833	0,417	0,418
9	20	2	37	0,620	0,705	0,625	2,010
10	15	2	30	0,938	0,533	0,303	0,418
11	25	2	30	0,690	3,393	1,470	3,490
12	25	5	30	0,980	2,063	0,780	2,695
13	20	2	23	1,653	1,288	0,680	0,808
14	20	5	23	1,545	1,398	0,575	0,610
15	20	3.5	30	1,318	4,820	1,793	3,280
16	20	3.5	30	1,988	4,015	3,113	3,175
17	20	3.5	30	1,085	1,950	2,320	2,958

Les concentrations (g/L) des BS sont présentées à la Figure 5.4

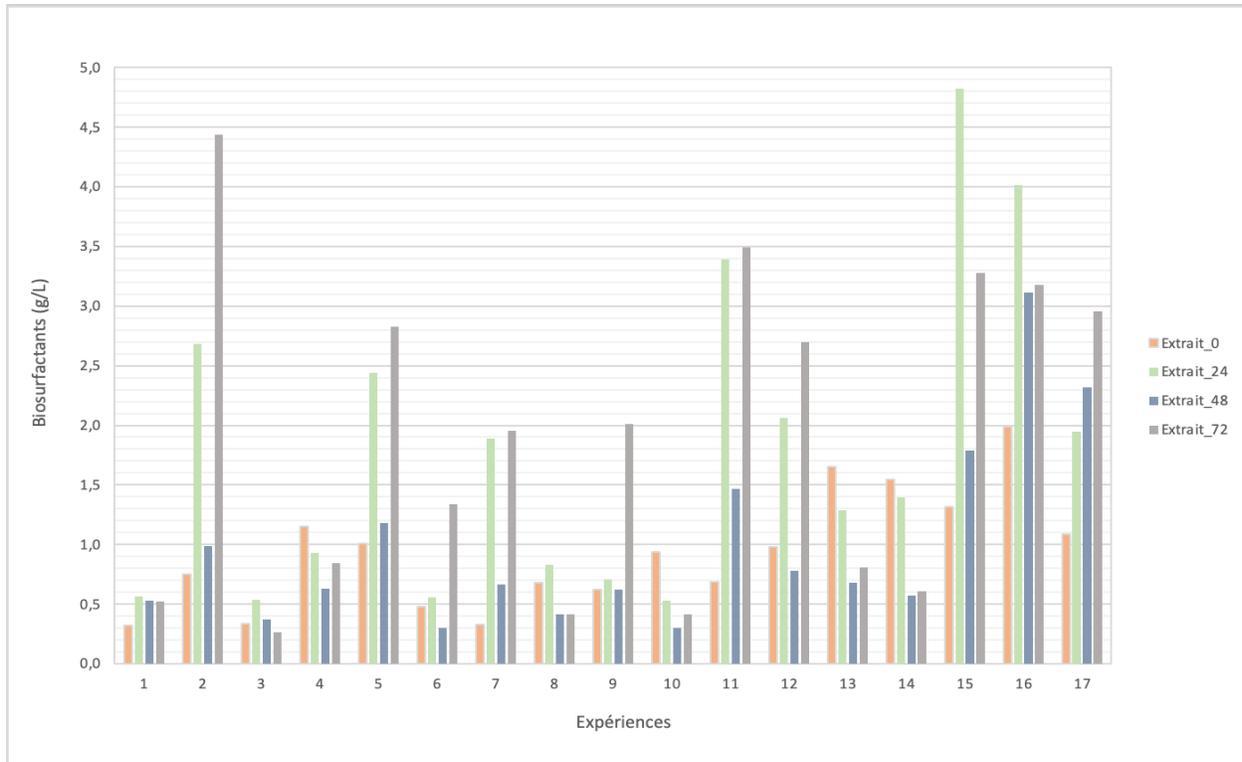


Figure 5.4 Concentrations (g/L) des BS pour le plan d'expérience de *Bacillus subtilis* - SIW

Tableau 5-10 Indices d'émulsification IE₂₄ mesurés sous différentes conditions de fermentation par *Bacillus subtilis*

Run	Variables d'entrée			Réponses			
	ST (g/L)	Inoculum (%)	Température (°C)	IE ₂₄ (%) 0 h	IE ₂₄ (%) 4 h	IE ₂₄ (%) 48 h	IE ₂₄ (%) 72 h
1	15	3.5	23	5	1	1	1
2	20	3.5	30	1	20	10	60
3	15	3.5	37	0	1	0	0
4	25	3.5	23	8	1	0	0
5	20	3.5	30	0	20	13	28
6	25	3.5	37	0	4	0	6
7	15	5	30	0	35	3	33
8	20	5	37	0	1	0	0
9	20	2	37	0	3	0	15
10	15	2	30	0	15	0	0
11	25	2	30	0	15	12	40
12	25	5	30	0	9	0	12
13	20	2	23	5	3	0	1
14	20	5	23	0	1	0	0
15	20	3.5	30	0	20	14	20
16	20	3.5	30	0	15	30	30
17	20	3.5	30	0	25	25	30

5.3.3 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Le Tableau 5-11 et la Figure 5.5 présente respectivement les résultats des extraits à partir des 17 séries de fermentations en fioles agitées de *Bacillus licheniformis* et les histogrammes en barres de ces extractions.

Les extractions ont été réalisées sur tous les MRF en condition de fermentation (à T24, T48 et T72) et sans inoculation (à T0). Les résultats obtenus des extraits_0h sont utilisés comme base comparative par rapport aux extraits à 24, 48 et 72 h et permettent de corriger les résultats obtenus. Les quantités d'extraits sont relativement faibles pour toutes les expérimentations. Avec le culot de fermentation du MRF Kruger qui se transfère dans le surnageant, des erreurs et décalages de résultats se notent surtout entre les extraits à T0 et T24 h. Les extraits contiennent notamment du BS et d'autres composés précipités.

L'essai 17 à la Figure 5.4 donne un pic maximal de 2,288 g/L de surnageant à 72 h de fermentation. Des extraits moyens se notent aux expérimentations 4, 6 et 11 pour T72. Selon ces conditions de fermentation, une concentration satisfaisante en BS peut être obtenue entre 37 et 41°C.

Ces deux résultats indiquent que pour la bactérie *Bacillus licheniformis*, la température optimale de croissance est de 37°C pour la production de BS. En effet, le milieu Kruger est composé de carbones et de

protéines complexes qui ne sont pas facilement dégradables. Ceci entraîne une induction de la production de biosurfactant qui sert à faciliter l'action enzymatique de la dégradation de ces molécules complexes en simples nutriments (Hellmuth et Dreja, 2016).

Le tableau d'indice d'émulsification IE₂₄ (Tableau 5-12) montre des valeurs élevées (de 66 à 85%) entre 24 et 72 h ; comparativement aux surfactants donnant une valeur maximale de 72,5 % pour le Triton X-100. Par ailleurs une émulsion est observée à T0 sur tous les surnageants. Le milieu Kruger contient des molécules capables de créer une émulsion avec du kérosène. L'évaluation qualitative de la présence de BS dans un milieu intègre aussi la présence d'autres molécules capables de créer une émulsion.

La combinaison des extraits et des IE₂₄ donne la combinaison suivante pour la mise à l'échelle en bioréacteur de 5 L de la culture de *Bacillus licheniformis* à partir du MRF Kruger : ST de 25 g/L, concentration d'inoculum de 5% et température de 37°C.

Tableau 5-11 Concentrations en extraits de BS (g/L) mesurées sous différentes conditions de fermentation par *Bacillus licheniformis*

Run	Variables d'entrée			Réponses			
	ST (g/L)	Inoculum (%)	Température (°C)	Extrait_0 h (g/L)	Extrait_24 h (g/L)	Extrait_48 h (g/L)	Extrait_72 h (g/L)
1	20	3.5	37	0,845	0,770	1,253	1,333
2	15	2	37	0,687	0,508	0,682	0,853
3	15	3.5	41	0,858	0,538	0,880	0,843
4	25	2	37	0,810	0,760	1,210	1,558
5	20	3.5	37	1,038	0,770	1,085	1,348
6	25	3.5	41	0,875	0,783	1,383	1,550
7	20	3.5	37	0,935	0,750	1,405	1,080
8	25	3.5	33	0,880	0,798	0,972	1,233
9	20	2	41	0,987	0,798	1,370	1,335
10	20	3.5	37	0,940	0,753	1,125	1,233
11	20	5	41	0,980	0,708	1,138	1,603
12	15	5	37	0,638	0,493	0,672	0,737
13	20	3.5	37	0,972	1,018	1,260	1,340
14	20	5	33	0,820	0,915	1,030	1,140
15	15	3.5	33	0,533	0,545	0,780	0,903
16	20	2	33	0,900	0,683	1,058	1,253
17	25	5	37	0,758	0,580	1,278	2,288

Les extractions sont visualisées avec les histogrammes en barres de la Figure 5.5.

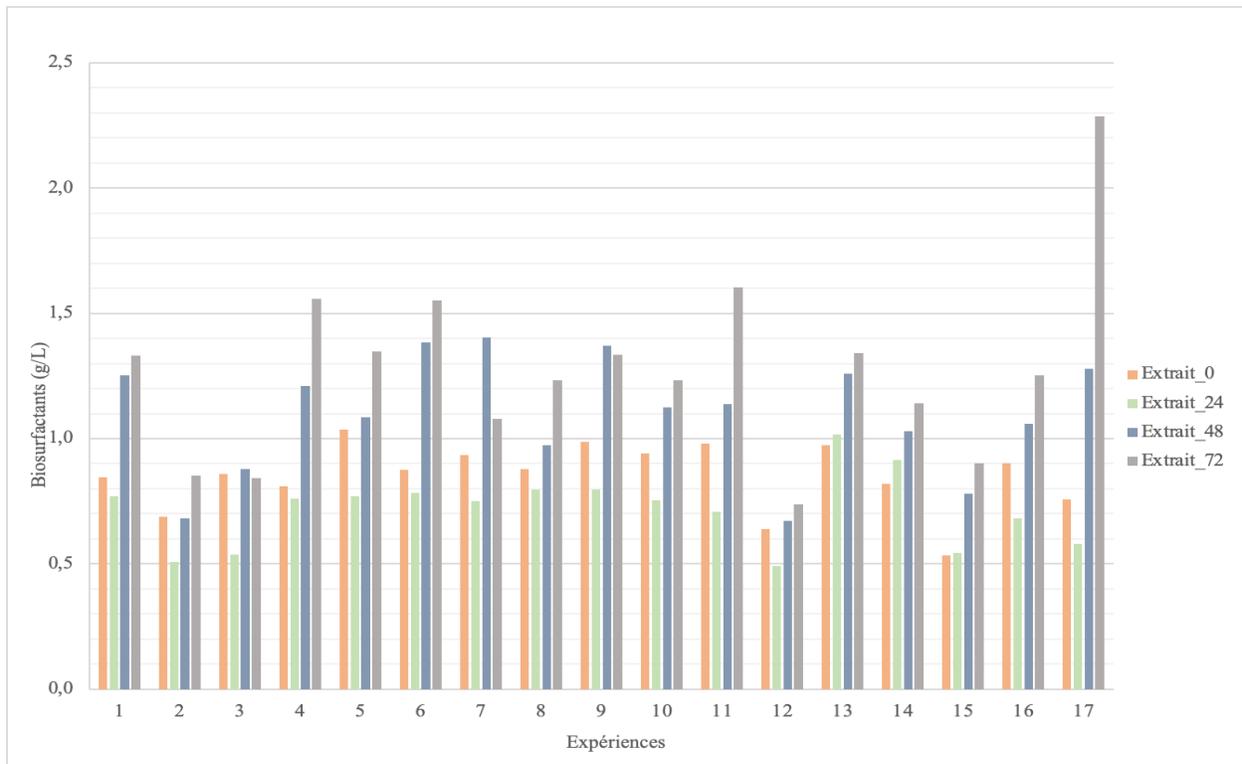


Figure 5.5 Concentration (g/L) des BS pour le plan d'expérience de *Bacillus licheniformis* - Kruger

Tableau 5-12 Indice d'émulsification IE₂₄ mesurés sous différentes conditions de fermentation par *Bacillus licheniformis*

Run	Variables d'entrée			Réponses			
	ST (g/L)	Inoculum (%)	Température (°C)	IE ₂₄ (%) 0 h	IE ₂₄ (%) 24 h	IE ₂₄ (%) 48 h	IE ₂₄ (%) 72 h
1	20	3.5	37	20	70	73	80
2	15	2.0	37	10	70	83	81
3	15	3.5	41	15	73	79	81
4	25	2.0	37	15	74	80	81
5	20	3.5	37	10	66	75	79
6	25	3.5	41	10	70	74	78
7	20	3.5	37	10	71	76	77
8	25	3.5	33	10	66	72	72
9	20	2.0	41	7,5	70	80	83
10	20	3.5	37	15	70	75	76
11	20	5.0	41	30	73	79	83
12	15	5.0	37	10	66	75	75
13	20	3.5	37	15	72	80	71
14	20	5.0	33	15	75	80	81
15	15	3.5	33	20	75	79	79
16	20	2.0	33	10	75	79	85
17	25	5.0	37	15	75	80	80

Remarque : les petits volumes de fermentation en fioles agitées ainsi que les nombreux échantillonnages n'ont pas permis d'effectuer toutes les analyses d'évaluation de production de composés extracellulaires.

5.4 Fermentations en bioréacteurs de 5 L

Les fermentations en fioles agitées ont permis de sélectionner les paramètres optimaux pour chacune des souches présentant la meilleure croissance cellulaire et les meilleurs résultats de caractérisation de composés extracellulaires produits dans les MRF.

Les résultats en bioréacteurs (en duplicata) à partir des paramètres optimisés en fioles agitées sont détaillés ci-dessous pour les trois microorganismes.

5.4.1 *Starmerella bombicola* ATCC 22214/SIW

Les tableaux suivants Tableau 5-13 et Tableau 5-14 donnent les résultats de croissance cellulaire et de suivi de paramètres du bioréacteur pour les essais 1 et 2. Les croissances cellulaires log₁₀(CFU/mL) des inocula de PC₁ et PC₂ étaient respectivement à 3,40 et 7,90 pour le premier essai (BR1) et à 4,82 et 7,97 pour le

deuxième essai (BR2). Ils ont permis à la souche de pouvoir s'y développer et de s'adapter au milieu SIW avant l'ensemencement en bioréacteur, en tenant compte des croissances cellulaires de *Starmerella bombicola* dans les MSS (Tableau 8-3) dont les \log_{10} sont respectivement de 9,13 et 9,16 à 24 et 48 h de fermentation.

Globalement, BR1 et BR2 ont eu la même tendance de profil de croissance cellulaire alors que le pH était contrôlé pour l'un et non contrôlé pour l'autre. Le non-contrôle du pH dans le bioréacteur permet de suivre les variations des paramètres et de tester son influence. La variation du pH jusqu'à un maximum de 8,9 à T60 pour BR1 n'influe pas sur les performances de la croissance cellulaire. Les différentes phases des courbes de croissance cellulaire se déroulent comme suit : de 0 à 6 h pour la phase de latence, de 6 à 24 h pour la phase exponentielle de croissance, de 24 à 60 h pour la phase stationnaire et de 60 à 72 h pour la phase de déclin. Un léger déclin des cellules est observé entre 12 et 18 h; ce qui peut être dû à la baisse du taux d'oxygène dissout (OD) dans le réacteur et à la variation de pH. En effet, pour BR1 l'OD a considérablement baissé jusqu'à 11,1% malgré une agitation de 500 rpm et une aération proche de 0,5 L/min. L'augmentation de l'aération à une valeur proche de 1 L/min entre 12 et 18 h a permis d'augmenter l'OD. Pour BR2, une augmentation de l'OD a plutôt été noté, de 45,9 à 77,3% entre 12 et 18 h.

Pendant les phases stationnaires de croissance et de déclin, les nutriments nécessaires au développement cellulaire sont épuisés ou tendent à l'épuisement au vu de la densité cellulaire obtenue. À ce moment de la fermentation, une concentration des extraits est mesurée chez *Starmerella bombicola* à T48 et T72 par rapport aux T12 et T24 (résultats du Tableau 5-15). La production de BS s'accumule à partir de la phase stationnaire pour *Starmerella bombicola*; laissant ainsi voir une croissance cellulaire et une production de métabolites secondaires qui augmentent en fonction du temps; elles suivent une croissance associée c'est-à-dire que la production d'extraits coïncide avec celle de la multiplication cellulaire. La disponibilité des nutriments à T0 n'influe pas sur la production de BS, mais sur la croissance cellulaire, qui a son tour permet la production maximale de BS pendant les phases stationnaires et de déclin. La quantité d'extraits à T0 (0,23 et 0,50 g/L de bouillon respectivement pour BR1 et BR2) peut être associée à la présence de molécules qui précipitent (comme les BS) à pH 2 avec HCL. Le Tableau 5-19 des résultats des IE₂₄ montre la même tendance que pour les extraits avec un maximum obtenu à T72 de 50 pour BR1 et 30 pour BR1 pour les surnageants bruts de fermentation.

Les données de TS des surnageants bruts des deux bioréacteurs (Tableau 5-16) montrent une faible diminution de la valeur de la TS par rapport à celle de l'eau : la valeur la plus faible de TS est obtenue à T48 avec 49,19 dyn/cm pour BR1 et 56,64 dyn/cm pour BR2 contre 72,70 dyn/cm pour l'eau. De plus, le milieu SIW stérilisé (sans inoculation) a une valeur de TS de 49,26; ce qui témoigne de la présence de

molécules aux propriétés tensioactives dans le milieu SIW avant même une fermentation avec *Starmerella bombicola*.

L'utilisation des membranes de concentrations pour la TS (Tableau 5-17 et Tableau 5-18) et pour les IE₂₄ (Tableau 5-19) montre que la membrane 2K à 2000 g/mol permet de concentrer les glycolipides (500 à 1500 g/mol) contenant dans les surnageants de fermentation de *Starmerella bombicola*. Le milieu SIW servant de contrôle présente des molécules aux propriétés tensioactives capables de créer une émulsion avec du kérosène et d'abaisser la TS. Les filtrats ont des valeurs de TS plus élevés et d'IE₂₄ plus faibles comparés à celles pour les rétentats (c'est-à-dire les concentrés).

Malgré une bonne croissance cellulaire dans le milieu SIW de la levure *Starmerella* et des extraits qui augmentent en fonction de la durée de fermentation, l'évaluation des paramètres qualitatives de TS et d'IE₂₄ ne permet pas de confirmer une bonne production de BS, des analyses plus approfondies comme la caractérisation biochimique et la CMC seraient utiles pour statuer sur la présence de glycolipides types sphorolipides dans les surnageants de fermentation.

Tableau 5-13 Essai BR1 de fermentation de 5 L de *Starmerella bombicola*

Temps (h)	Conc. (CFU/mL)	Log ₁₀ (CFU/mL)	pH	Aération (L/min)	Agitation (rpm)	OD (%)
0	7,50E+03	3,88	6,31	<0,5	300	80,8
3	7,45E+04	4,87	6,23	<0,5	300	48,6
6	1,19E+05	5,08	6,24	<0,5	400	73,2
9	5,70E+06	6,76	6,31	<0,5	400	37,6
12	1,48E+07	7,17	7,04	<0,5	500	11,1
16	1,27E+07	7,10	7,31	<1	600	28,7
18	1,37E+07	7,14	7,16	<0,5	600	37,8
21	7,40E+07	7,87	7,12	<1	550	47,5
24	2,96E+08	8,47	7,46	<1	550	53,3
30	4,00E+08	8,60	8,02	<1	430	73,8
36	3,90E+08	8,59	8,45	<1	300	70,5
42	3,77E+08	8,58	8,70	<1	300	73,0
48	3,74E+08	8,57	8,75	<1	300	70,6
60	3,20E+08	8,51	8,90	<1	300	63,5
72	2,84E+08	8,45	8,62	<1	300	55,2

La température a été maintenue à 25°C.

PC1 à 24 h de fermentation : 2,50 x 10³ CFU/mL (3,40 Log₁₀ (CFU/mL)).

PC2 à 24 h de fermentation : 7,90 x 10⁷ CFU/mL (7,90 Log₁₀ (CFU/mL)).

La fermentation pour BR1 est effectuée sans contrôle de pH (le pH était fixé à $6,20 \pm 0,2$ en début d'inoculation).

Il n'y a pas eu d'ajout d'antimousse; la formation de mousse était contrôlée en diminuant la vitesse d'agitation quand elle apparaissait et en maintenant l'aération à une valeur inférieure à 1 L/min.

Tableau 5-14 Essai BR2 de fermentation de 5 L de *Starmerella bombicola*

Temps (h)	Conc. (CFU/mL)	Log ₁₀ (CFU/mL)	pH	Aération (L/min)	Agitation (rpm)	OD (%)
0	5,05E+04	4,70	6,2	<0,5	300	57,1
3	1,64E+04	4,21	6,2	<0,5	300	40,2
6	1,56E+04	4,19	6,2	<0,5	300	26,2
9	1,16E+06	6,06	6,2	<0,5	500	61,0
12	8,15E+06	6,91	6,2	<0,5	500	45,9
16	1,04E+07	7,02	6,2	<0,5	500	62,0
18	6,70E+06	6,83	6,2	<0,5	500	77,3
21	2,43E+08	8,39	6,2	<0,5	400	51,7
24	2,44E+08	8,39	6,2	<0,5	400	48,6
30	2,64E+08	8,42	6,2	<1	310	61,9
36	2,61E+08	8,42	6,2	<1	300	72,7
42	2,69E+08	8,43	6,2	<1	300	81,3
48	2,59E+08	8,41	6,2	<1	300	71,4
60	2,43E+08	8,39	6,2	<1	300	62,6
72	1,33E+08	8,12	6,2	<1	300	69,3

La température a été maintenue à 25°C.

PC1 à 24 h de fermentation : $6,60 \times 10^3$ CFU/mL (4,82 Log₁₀ (CFU/mL)).

PC2 à 24 h de fermentation : $9,25 \times 10^7$ CFU/mL (7,97 Log₁₀ (CFU/mL)).

Le pH pour BR2 était contrôlé à 6,20 avec H₂SO₄ 4N et NaOH 4N. Il n'y a pas eu d'ajout d'antimousse durant toute la fermentation.

Les courbes de croissance cellulaire des deux essais sont visualisées à la figure suivante (Figure 5.6).

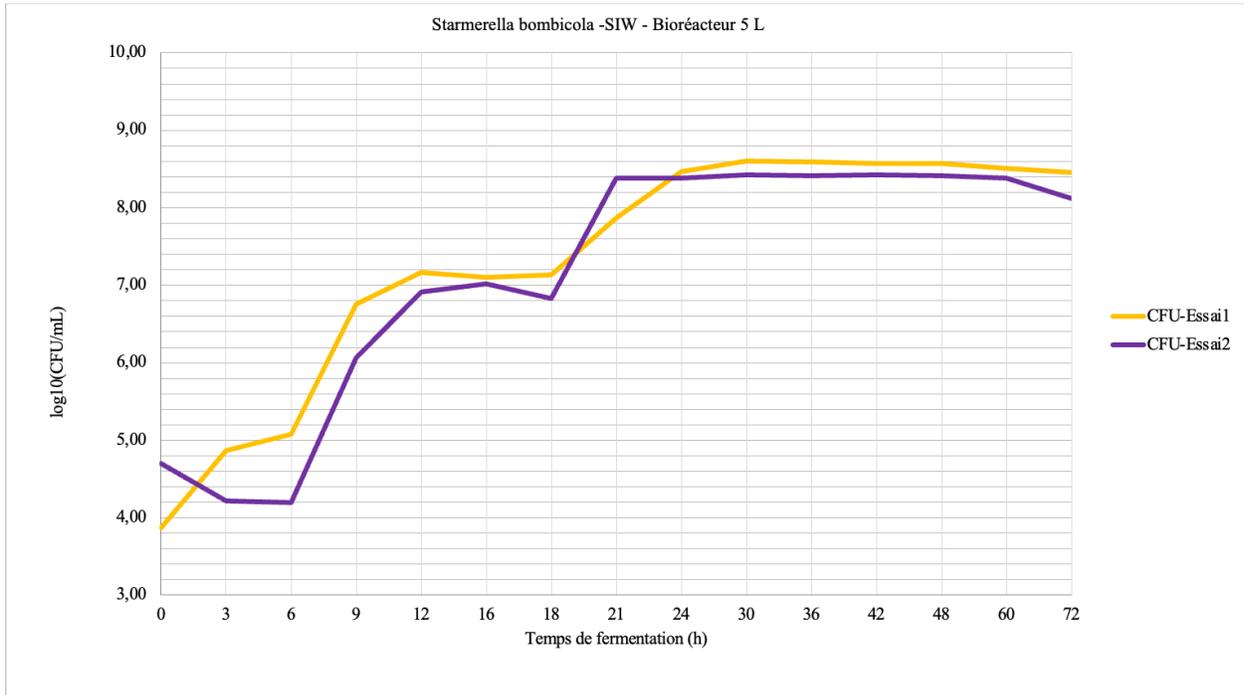


Figure 5.6 Courbes de croissance en bioréacteur de 5 L pour *Starmerella bombicola*

Les extractions ont été faites sur les échantillons prélevés à 0, 12, 24, 48 et 72 h, en plus du milieu SIW brut. Ci-joint le tableau de résultats (Tableau 5-15) :

Tableau 5-15 Précipitation de composés extracellulaires pour *Starmerella bombicola* en BR1 et BR2

Temps de fermentation (h)	Extrait sec de biosurfactant (g/L)			
	BR1		BR2	
	g/L de surnageant	g/L bouillon de fermentation	g/L surnageant	g/L bouillon de fermentation
0	0,25	0,23	0,55	0,50
12	0,65	0,60	0,45	0,41
24	0,45	0,41	0,55	0,50
48	1,45	1,33	0,75	0,69
72	1,2	1,10	1,2	1,10
Témoin : SIW stérilisé	0,65	0,60	-	-

L'extraction du milieu SIW, stérilisé avant inoculation, permet d'avoir une idée sur la quantité de composés présents dans le milieu brut de SIW stérilisé et pouvant être précipités par HCl 6N à pH 2.

Entre 0 et 24 h, la quantité des extraits de BR1 et BR2 est inférieure ou égale à celle de SIW stérilisé malgré une bonne croissance cellulaire. BR1 (sans contrôle de pH) donne la meilleure extraction à 48 h avec 1,33 g/L de bouillon de fermentation. Avec BR2, la quantité d'extrait la plus élevée est obtenue à 72 h, mais avec seulement 1,10 g/L de bouillon de fermentation.

La détermination de la TS avec la méthode de la goutte pendante a donné les résultats suivants :

Tableau 5-16 TS sur surnageant brut de *Starmerella bombicola* en bioréacteur de 5 L

Temps de fermentation (h)	TS (dyn/cm ou mN/m)	
	BR1	BR2
0	51,55	51,38
12	52,33	57,59
24	53,20	58,45
48	49,19	56,64
72	56,22	56,40
SIW stérilisé	49,26	
SIW non stérilisé	46,22	

Tableau 5-17 TS sur surnageant concentré 1K de *Starmerella bombicola* en bioréacteur de 5 L

Temps de fermentation (h)	Rétentat		Filtrat	
	BR1	BR2	BR1	BR2
12	56,07	57,39	67,57	63,14
24	53,26	57,00	69,40	67,75
48	50,44	56,37	69,19	67,76
72	56,95	56,52	69,63	67,84

Tableau 5-18 TS sur surnageant concentré 2K de *Starmerella bombicola* en bioréacteur de 5L

Temps de fermentation (h)	Rétentat		Filtrat	
	BR1	BR2	BR1	BR2
12	53,33	55,82	60,66	63,91
24	52,90	57,54	62,80	63,12
48	48,37	54,62	63,01	63,52
72	56,31	55,56	65,33	59,49

Les mesures ont été faites sur les surnageants bruts de fermentation et sur les surnageants concentrés avec les membranes 1K et 2K.

Tableau 5-19 Mesure des IE₂₄ pour *Starmerella bombicola* en BR1 et BR2

Temps de fermentation (h)	Surnageant brut		Rétentat 1K		Rétentat 2k	
	BR1	BR2	BR1	BR2	BR1	BR2
12	1	5	1	5	1	9
24	0	0	0	0	0	0
48	30	1	45	1	37	1
72	50	30	40	25	50	45
SIW stérilisé	13					
SIW non stérilisé	10					

5.4.2 *Bacillus subtilis* ATCC 6633/SIW

Les tableaux suivants (Tableau 5-20 et Tableau 5-21) donnent les résultats de croissance cellulaire et de suivi de paramètres du bioréacteur pour les essais 1 et 2. Le dénombrement cellulaire log₁₀ (CFU/mL) des inocula de PC₁ et PC₂ était respectivement à 5,77 et 8,34 pour le premier essai (BR1) et à 8,12 et 8,42 pour le deuxième essai (BR2). Les concentrations en CFU/mL y sont importantes de même que la concentration des spores pour PC₂ avec un log₁₀(CFU/mL) de 5,63 pour BR1 et 6,10 pour BR2. La présence élevée de spores peut accentuer le temps de latence après inoculation. Cependant, dans BR1 et BR2, pour la croissance cellulaire (Figure 5.7), la phase de latence n'a duré que 3 h, il s'en est suivi une croissance exponentielle très courte entre 3 et 6 h; puis une phase stationnaire longue de 6 à 30 h et enfin un déclin cellulaire jusqu'en fin de fermentation. La concentration en spores viables n'était pas importante (avant 12 h pour BR1 et 24 h pour BR2) au point d'inhiber la croissance cellulaire.

L'évolution de la croissance cellulaire, malgré un suivi et un contrôle de pH différents, est similaire dans les deux bioréacteurs. La variation du pH dans BR2 (valeur maximale de 8,69 à T24 par rapport à l'optimum 7) n'a pas eu d'effet négatif sur la croissance cellulaire comparativement au BR1 où le pH était contrôlé. Par rapport à ce paramètre, la fermentation du milieu SIW par *Bacillus subtilis* peut être menée sans contrôle de pH. L'épisode de baisse en phase stationnaire du BR1 correspond à un taux d'OD de 0% en T24. Pour BR2, la phase de déclin cellulaire correspond à un taux d'OD bas de 31,1% à T60 contre 45,4% à T48.

La productivité d'extraits extracellulaires (Tableau 5-22) est importante pendant la phase stationnaire de croissance; en effet elle passe pour BR1 de 0,38 à T12 à 1,61 g/L de bouillon de fermentation à T48 et pour BR2 de 0,41 à T12 à 1,10 g/L de bouillon de fermentation à T72. La concentration des extraits du témoin

à T0 présente des valeurs de 0,55 et 0,65 g/L de bouillon fermenté respectivement pour BR1 et BR2 et confirme la présence de molécules précipitées dans le milieu SIW stérilisé, mais à faible quantité. Pendant la phase stationnaire, la production de BS est plus importante que pour toute autre période de fermentation de *Bacillus subtilis*. Ceci montre une production en décalée entre la croissance cellulaire et la production de métabolites. Il existe donc un mécanisme de stress métabolique dû au manque de nutriments dans le milieu qui contribue à la production de BS.

Cependant les résultats de TS (Tableau 5-23 et Tableau 5-24) et d'IE₂₄ (Tableau 5-25) ne confirment pas la présence de molécules aux propriétés tensioactives efficaces capables d'abaisser la tension de support par rapport à celle de l'eau. Les meilleures réductions de TS obtenues, à T60 pour BR1 (58,14 dyn/cm) et à T24 pour BR2 (55,30 dyn/cm), correspondent aux valeurs maximales d'extraits obtenus, mais restent inférieures au contrôle- SIW stérilisé sans inoculation (49,26 dyn/cm). Ceci indique la présence de molécules aux propriétés tensioactives dans le milieu contrôle, avant même une fermentation et que la fermentation du milieu par *Bacillus subtilis* n'a pas d'effet significatif pour la production de BS. Les résultats d'IE₂₄ non plus ne concordent pas aux résultats de fermentation et d'extractions cellulaires malgré la présence d'émulsion stable avec les membranes de concentration.

Selon les méthodes d'analyse de la production de BS utilisées, les quantités d'extraits augmentent en fonction de la fermentation avec une bonne croissance cellulaire, mais l'évaluation qualitative sur les propriétés des molécules ne permet pas de confirmer la présence de lipopeptides bactériens. Une purification des extraits et une analyse moléculaire pourraient confirmer ou infirmer la présence de lipopeptides et évaluer les molécules dans le milieu SIW de départ.

Tableau 5-20 Essai BR1 de fermentation de 5 L de de *Bacillus subtilis*

Temps (h)	Conc. (CFU/mL)	Log ₁₀ (CFU/mL)	Conc. (Spores/mL)	Log ₁₀ (Spores/mL)	DO (%)	Aération (L/min)	Agitation (rpm)
0	5,25E+06	6,72	8,95E+03	3,95	61,9	<0,5	300
3	4,60E+06	6,66	1,29E+04	4,11	37,0	<0,5	550
6	4,85E+08	8,69	2,25E+04	4,35	37	2	600
9	1,21E+09	9,08	1,65E+04	4,22	21,4	3	600
12	1,30E+09	9,11	3,75E+08	8,57	50,8	3	600
24	7,05E+08	8,85	3,75E+08	8,57	0,0	2	600
30	3,60E+08	8,56	2,55E+08	8,41	48	<1	600
36	3,30E+08	8,52	1,48E+08	8,17	79,6	<0,5	500
48	3,05E+08	8,48	1,39E+08	8,14	79,6	<0,5	500
60	2,67E+08	8,43	1,82E+08	8,26	5,5	<0,5	450
72	2,84E+08	8,45	1,91E+08	8,28	97,4	<1	450

La température a été maintenue à 30°C.

PC1 à 19 h de fermentation : 2,65 x 10⁷ CFU/mL (7,42 Log₁₀ (CFU/mL)), 5,95 x 10⁵ spores/mL (5,77 Log₁₀ (spores/mL)).

PC2 à 16 h 20 de fermentation : 2,18 x 10⁸ CFU/mL (8,34 Log₁₀ (CFU/mL)), 4,25 x 10⁵ spores/mL (5,63 Log₁₀ (spores/mL)).

Particularités BR1 : pH contrôlé à 7,0, ajout d'anti-mousse après T3, T12 et T60.

Tableau 5-21 Essai BR2 de fermentation de 5 L de *Bacillus subtilis*

Temps (h)	Conc. (CFU/mL)	Log ₁₀ (CFU/mL)	Conc. (Sp./mL)	Log ₁₀ (Sp./mL)	pH	DO (%)	Aération (L/min)	Agitation (rpm)
0	5,85E+06	6,77	4,57E+04	4,66	7,13	72,2	<0,5	300
3	2,87E+07	7,46	4,30E+04	4,63	6,88	35,6	<0,5	401
6	7,30E+08	8,86	6,65E+04	4,82	8,15	25,5	2	600
9	6,55E+08	8,82	3,60E+04	4,56	8,45	34,6	1	600
12	6,85E+08	8,84	3,65E+07	7,56	8,45	34,6	<0,5	300
24	9,20E+08	8,96	4,60E+08	8,66	8,69	88,3	<1	550
30	7,90E+08	8,90	2,01E+08	8,30	8,64	45,2	<0,5	300
36	4,90E+08	8,69	1,45E+08	8,16	8,65	44,8	<0,5	300
48	5,05E+08	8,70	9,15E+07	7,96	8,65	45,4	<0,5	300
60	1,19E+09	9,08	5,40E+08	8,73	8,37	31,1	<0,5	350
72	8,85E+07	7,95	5,95E+07	7,77	8,15	33,1	<0,5	350

La température a été maintenue à 30°C.

PC1 à 18 h de fermentation : 1,32 x 10⁸ CFU/mL (8,12 Log₁₀ (CFU/mL)), 6,90 x 10⁶ spores/mL (6,84 Log₁₀ (spores/mL)).

PC2 à 19 h 30 de fermentation : 2,65 x 10⁸ CFU/mL (8,42 Log₁₀ (CFU/mL)), 1,27 x 10⁶ spores/mL (6,10 Log₁₀ (spores/mL)).

Particularités BR2 : pH non contrôlé, ajout d'anti-mousse entre T3 et T6, après T12, à T53 et après T60.

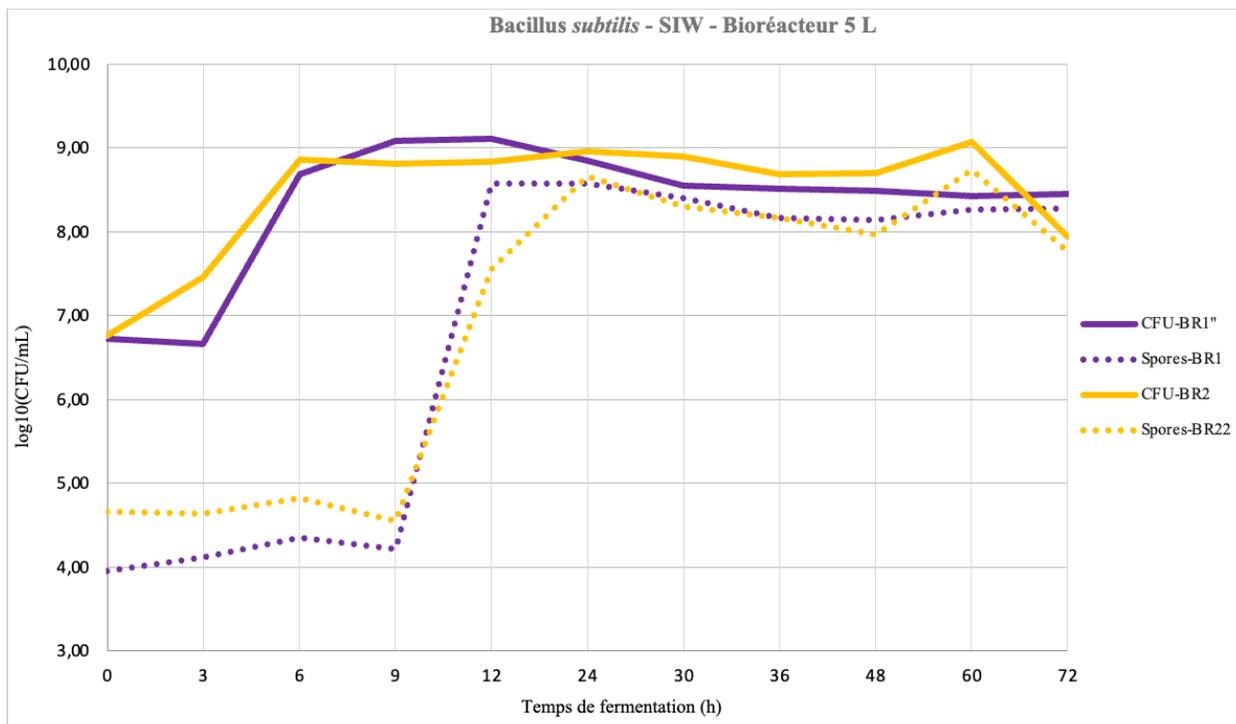


Figure 5.7 Courbes de croissance en bioréacteur de 5 L pour *Bacillus subtilis*

Les extractions ont été effectuées sur les échantillons prélevés à 0, 12, 24, 36, 48, 60 et 72 h, en plus du milieu SIW brut stérilisé. Ci-joint le tableau de résultats (Tableau 5-22) de la précipitation de composés extracellulaires de *Bacillus subtilis* avec HCl 6N à pH 2.

Tableau 5-22 Précipitation de composés extracellulaires pour *Bacillus subtilis* en BR1 et BR2

Temps de fermentation (h)	Extrait sec de biosurfactant (g/L) – <i>Bacillus subtilis</i>			
	BR1		BR2	
	g/L de surnageant	g/L bouillon de fermentation	g/L surnageant	g/L bouillon de fermentation
0	0,60	0,55	0,67	0,65
12	0,40	0,38	0,55	0,51
24	1,30	1,29	1,20	1,16
36	1,60	1,49	1,20	1,16
48	1,70	1,61	1,30	1,25
60	1,40	1,31	1,10	1,05
72	1,30	1,23	1,30	1,26
Témoin : SIW stérilisé	0,65	0,60	-	-

Le milieu SIW stérilisé sert de témoin pour les résultats.

Les mesures ont été réalisées sur les surnageants bruts de fermentation et sur les surnageants concentrés avec les membranes 2K. Seule la membrane 2K (2000 g/mol) a été utilisée dans ce cas pour *Bacillus subtilis* car les surfactine à un poids molaire de 1036,3 g/mol; donc supérieure à celui de la membrane 1K (1000 g/mol).

La détermination de la TS avec la méthode de la goutte pendante a donné les résultats suivants (Tableau 5-23 et Tableau 5-24):

Tableau 5-23 TS sur surnageant brut de *Bacillus subtilis* en bioréacteur de 5 L

Temps de fermentation (h)	TS (dyn/cm ou mN/m)	
	BR1	BR2
0	53,40	54,09
12	60,89	60,57
24	61,20	55,30
36	60,63	61,04
48	58,18	61,17
60	58,14	63,18
72	60,80	60,44
SIW stérilisé	49,26	
SIW non stérilisé	46,22	

Tableau 5-24 TS sur surnageant concentré 2K de *Bacillus subtilis* en bioréacteur de 5 L

Temps de fermentation (h)	Rétentat		Filtrat	
	BR1	BR2	BR1	BR2
0	50,59	53,15	66,65	58,18
12	61,40	56,97	65,30	64,98
24	55,68	55,21	63,95	64,93
36	56,73	59,19	64,41	65,86
48	53,47	60,66	65,89	66,11
60	58,47	61,27	63,90	66,73
72	62,06	59,74	66,69	68,08

Les mesures ont été réalisées sur les surnageants bruts de fermentation et sur les surnageants concentrés de ses membranes 1K et 2K. Ci-après les tableaux de résultats (Tableau 5-25). Une mesure de l'IE₂₄ a été faite

sur le concentré avec la membrane 1K du surnageant de l'échantillon à 48 h de fermentation de BR1. Ceci a permis d'avoir une idée du degré de concentration des lipopeptides de *Bacillus subtilis* par son influence sur l'indice d'émulsification.

Tableau 5-25 Mesure des IE₂₄ pour *Bacillus subtilis* en BR1 et BR2

Temps de fermentation (h)	Surnageant brut		Rétentat 2K		Rétentat 1k
	BR1	BR2	BR1	BR2	BR1
0	0	1	0	0	-
12	0	0	2	0	-
24	10	1	32	0	-
36	15	7	30	20	-
48	3	40	54	20	50
60	0	0	0	10	-
72	0	0	0	0	-
SIW stérilisé	13				
SIW non stérilisé	10				

5.4.3 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580/Kruger

Les tableaux suivants (Tableau 5-26 et Tableau 5-27) donnent les résultats de croissance cellulaire et de suivi de paramètres du bioréacteur pour les essais 1 et 2. La croissance de *Bacillus licheniformis* dans les deux bioréacteurs (Figure 5.8) est restée faible malgré un log₁₀ de l'inoculum PC₂ à 8,39 pour BR1 et 9,01 pour BR2. Pour BR1 la concentration initiale en spores viables est très importante à T0 avec un log₁₀ de 7,02 contre 7,11 pour les CFU. Ceci a inhibé la croissance cellulaire avec un temps de latence de 9 h et une faible croissance exponentielle passant de 7,28 à 8,12 entre 9 et 24 h; puis un arrêt de croissance jusqu'en fin de fermentation avec un log₁₀ de 7,89 à 72 h. le temps de production de l'inoculum de 18 h a impacté sur la prévalence des spores dans le milieu de culture.

Concernant BR2, la concentration initiale en spores viables est faible, mais la croissance cellulaire évoluait en dents de scie durant toute la durée de la fermentation. Le suivi des paramètres du bioréacteur donnait de faibles taux d'OD durant toute la fermentation et qui fluctuaient grandement. Les heures de chute de croissance correspondant à des OD faibles : 2% à T12, 28,4% à T48, etc. L'agitation augmentée à la vitesse maximale de 600 rpm avec une aération jusqu'à 1,3 L/min à T30 et T36 et 2 L/min à T24 n'ont pas contribué à maintenir l'OD à une valeur supérieure à 50%.

Les extractions (Tableau 5-28) ont donné des quantités faibles d'extraits pour tous les échantillons (0, 24 et 48 h) contenant notamment des biosurfactants et d'autres molécules du milieu Kruger. Les valeurs maximales sont obtenues à T24 pour BR1 (0,31 g/L bouillon de fermentation) et pour BR2 (0,51 g/L bouillon de fermentation), temps où la croissance cellulaire était maximale pendant la phase stationnaire. La croissance cellulaire est associée à la concentration en extraits présents dans le milieu.

Le Tableau 5-29 montre que les molécules contenues dans le surnageant de fermentation n'étaient pas capables d'abaisser la tension de surface; les valeurs étaient proches de celle de l'eau (69 dyn/cm pour la meilleure réduction à T72 pour les deux bioréacteurs).

Cependant si les valeurs d'IE₂₄ (Tableau 5-30) servent de référence à la production de surfactants, il y'a une bonne émulsion à T72 60% pour BR1 et 75% d'émulsion formée pour BR2. Le contrôle du milieu Kruger stérilisé est mesuré à 75%. La fermentation du milieu Kruger par *Bacillus licheniformis* avec la faible croissance cellulaire observées, les valeurs d'extraits, de TS et d'IE₂₄ n'est pas concluante au vu des résultats. L'ajout de substrats (par rapport aux besoins de la souche et de la composition du milieu) pourrait contribuer à améliorer la fermentation. Des analyses moléculaires des composés de fermentation permettraient aussi de statuer sur la nature de molécules de fermentation.

Tableau 5-26 Essai BR1 de fermentation de 5 L de *Bacillus licheniformis*

Temps (h)	Conc. (CFU/mL)	Log ₁₀ (CFU/mL)	Conc. (Spores/mL)	Log ₁₀ (Spores/mL)	DO (%)	Aération (L/min)	Agitation (rpm)
0	1,28E+07	7,11	1,04E+07	7,02	60,7	<1	300
3	1,50E+07	7,18	1,32E+07	7,12	31,7	<1	550
6	1,66E+07	7,22	1,40E+07	7,14	29,2	4	600
9	1,90E+07	7,28	1,63E+07	7,21	23,3	3	600
12	4,25E+07	7,63	2,25E+07	7,35	19,9	2,5	600
24	1,33E+08	8,12	1,11E+08	8,04	15,7	3	600
30	8,50E+07	7,93	6,20E+07	7,79	10,5	2	600
36	6,20E+07	7,79	5,75E+07	7,76	8,7	2	600
48	7,35E+07	7,87	6,45E+07	7,81	4,0	1	300
60	5,75E+07	7,76	4,25E+07	7,63	9,8	1,3	300
72	7,70E+07	7,89	1,60E+07	7,20	8,5	0,5	300

La température a été maintenue à 37°C.

PC1 à 18 h de fermentation : 1,31 x 10⁷ CFU/mL (7,12 Log₁₀ (CFU/mL)), 1,44 x 10⁵ spores/mL (5,16 Log₁₀ (spores/mL)).

PC2 à 15 h 30 de fermentation : 2,45 x 10⁸ CFU/mL (8,39 Log₁₀ (CFU/mL)), 1,44 x 10⁵ spores/mL (5,16 Log₁₀ (spores/mL)).

Particularités BR1 : pH fixé à 7,0, ajout d'anti-mousse à T24.

Tableau 5-27 Essai BR2 de fermentation de 5 L de *Bacillus licheniformis*

Temps (h)	Conc. (CFU/mL)	Log10 (CFU/mL)	Conc. (Sp./mL)	Log10 (Sp./mL)	pH	DO (%)	Aération (L/min)	Agitation (rpm)
0	3,20E+07	7,51	5,10E+03	3,71	6,95	52,3	<0,5	300
3	1,21E+08	8,08	9,25E+04	4,97	6,97	30,1	<0,5	500
6	2,05E+08	8,31	3,75E+05	5,57	7,08	43,8	<1	600
9	1,06E+09	9,03	8,75E+05	5,94	7,05	10,4	3,5	600
12	4,05E+08	8,61	2,12E+06	6,33	7,09	2,1	3,5	600
24	6,60E+08	8,82	3,35E+07	7,53	7,08	52,4	2	600
30	3,70E+08	8,57	1,68E+08	8,23	7,07	41,1	1,3	600
36	3,40E+08	8,53	2,74E+08	8,44	7,06	38,4	1,3	600
48	1,28E+08	8,11	1,21E+08	8,08	7,03	28,5	<0,5	600
60	1,83E+08	8,26	1,24E+08	8,09	7,08	28,4	<0,5	600
72	2,35E+08	8,37	1,18E+08	8,07	7,06	22,8	<0,5	400

La température a été maintenue à 37°C.

PC1 à 19 h 15 de fermentation : $7,95 \times 10^7$ CFU/mL (7,90 Log₁₀ (CFU/mL)), $4,35 \times 10^3$ spores/mL (3,64 Log₁₀ (spores/mL)).

PC2 à 19 h 30 de fermentation : $1,03 \times 10^9$ CFU/mL (9,01 Log₁₀ (CFU/mL)), $1,55 \times 10^5$ spores/mL (5,18 Log₁₀ (spores/mL)).

Particularités BR2 : agitation maximale à 400 rpm; antimousse (peu) ajouté seulement après 48 h de fermentation.

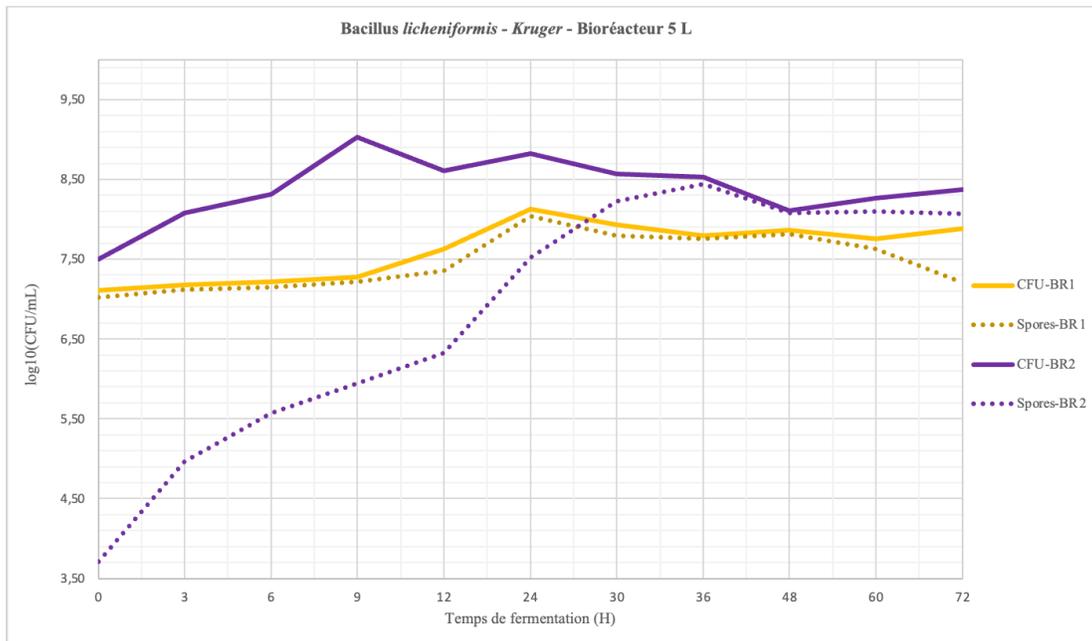


Figure 5.8 Courbes de croissance en bioréacteur de 5 L pour *Bacillus licheniformis*

Les extractions (Tableau 5-28) ont été faites sur les échantillons prélevés à 0, 24 et 48 h.

Tableau 5-28 Précipitation de composés extracellulaires pour *Bacillus licheniformis* en BR1 et BR2

Temps de fermentation (h)	Extrait sec de biosurfactant (g/L) – <i>Bacillus licheniformis</i>			
	BR1		BR2	
	g/L de surnageant	g/L bouillon de fermentation	g/L surnageant	g/L bouillon de fermentation
0	0,14	0,13	0,25	0,25
24	0,33	0,31	0,57	0,51
48	0,21	0,19	0,65	0,58

Les mesures ont été effectuées sur les surnageants bruts à 0, 24, 48 et 72 h de fermentation. La détermination de la TS avec la méthode de la goutte pendante a donné les résultats du Tableau 5-29 suivant :

Tableau 5-29 TS sur surnageant brut de *Bacillus licheniformis* en bioréacteur de 5 L

Temps de fermentation (h)	TS (dyn/cm ou mN/m)	
	BR1	BR2
0	73,15	69,49
24	72,99	66,88
48	70,09	71,81
72	69,00	69,00

Les mesures d'IE₂₄ ont été effectuées sur les surnageants bruts de fermentation (Tableau 5-30) avec des échantillonnages à 0, 24, 48 et 72 h.

Tableau 5-30 Mesure des IE₂₄ pour *Bacillus licheniformis* en BR1 et BR2

Temps de fermentation (h)	Surnageant brut	
	BR1	BR2
0	65	60
24	45	70
48	-	75
72	60	75
Kruger stérilisé	75	

6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La production de molécules tensioactives extracellulaires afin d'apporter une alternative écoresponsable aux surfactants d'origine chimique prend de plus en plus d'ampleur depuis ces dernières décennies. La recherche sur ce domaine s'articule principalement sur la production de biosurfactants et d'enzymes par fermentation microbienne à partir des matières résiduelles fermentescibles.

Les travaux de ce projet de recherche ont permis de sélectionner trois microorganismes capables de supporter la complexité des matières résiduelles fermentescibles pour la production de biosurfactants. La fermentation de la levure *Starmerella bombicola* et deux bactéries à savoir *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* ont été menées sur les milieux résiduels fermentescibles d'eaux usées d'amidon (SIW), de boues secondaires de papeterie (Kruger) et d'eaux résiduelles de brasserie.

La capacité des souches microbiennes à croître sur ces milieux complexes a été démontrée avec des stratégies de fermentation en fioles agitées et en bioréacteurs. Les résultats obtenus ont permis de constater que *Starmerella bombicola* et *Bacillus subtilis* étaient plus performantes sur le milieu SIW, tandis que *Bacillus licheniformis* se développait davantage sur le milieu Kruger.

Les différents essais de fermentation en fioles agitées ont permis de sélectionner les paramètres suivants pour les travaux en bioréacteurs :

Starmerella bombicola/SIW : 20 g/L de solides totaux, inoculum de 3,5% et température de 25°C. L'extrait de biosurfactant qui renseigne sur les biosurfactants produits y était de 9,95 g/L de bouillon de fermentation et pouvait créer une émulsion stable avec du kérosène jusqu'à une valeur de 62% d'émulsion.

Bacillus subtilis/SIW : 20 g/L de solides totaux, inoculum de 3,5% et température de 30°C. L'extrait de biosurfactant produit y est de 4,44 g/L de bouillon de fermentation et pouvait créer une émulsion stable avec du kérosène jusqu'à 60% d'émulsion.

Bacillus licheniformis/Kruger : 25 g/L de solides totaux, inoculum de 5% et température de 37°C. L'extrait de biosurfactant produit y est de 2,29 g/L de bouillon de fermentation et pouvait créer une émulsion stable avec du kérosène jusqu'à 80% d'émulsion.

Les fermentations en bioréacteurs de 5 L à partir de ces paramètres opératoires ont permis de contrôler et d'ajuster les paramètres cruciaux agissant sur la croissance cellulaire des souches telles que le pH, l'agitation, l'aération et l'oxygène dissout. Quant au non-contrôle du pH, les résultats témoignent d'un effet non significatif sur la croissance cellulaire et sur la production de BS.

Les analyses d'indice d'émulsion, de tension de surface et de croissance cellulaire obtenus à partir des fermentations en bioréacteurs de 5 L permettent d'affirmer que la production de biosurfactants est faisable à partir des milieux résiduels sélectionnés, ainsi que les microorganismes étudiés.

Au vu des résultats obtenus dans ces travaux de fermentation, il est recommandé comme perspectives pour les prochaines études à mener sur le sujet :

- D'analyser les composés moléculaires présents dans les surnageants de fermentation et de les comparer aux biosurfactants biologiques qui sont produits par les différentes souches microbiennes ;
- D'évaluer les concentrations micellaires critiques (CMC) de chaque extrait ;
- De faire une optimisation axée autour des sources de carbone en fonction des besoins du microorganisme. Par exemple, la productivité des lipides de sophorose par *Starmerella bombicola* est optimisée avec une supplémentation de 10% (v/v) d'huile de maïs et 2% de glucose comme sources de carbone et donnant une réduction de la TS à 28,56 dyn/cm (Elshafie et al., 2015) ;
- De trouver des alternatives à l'utilisation de solvants d'extraction comme méthodes de purification des biosurfactants afin d'éviter les extraits provenant d'autres sources autres que les biosurfactants ;
- De prévoir une analyse détaillée des coûts liés au traitement en aval du procédé de fermentation ;
- Continuer les travaux sur la comparaison des extraits de fermentations obtenus avec les surfactants les plus efficaces et présents dans la formulation des produits de nettoyage.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Akbari, N., et Biria, D. (2018). Investigation of the activity of *Acinetobacter calcoaceticus* biodemulsifier to break stable water in oil emulsions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4144-4150. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.05.057>
- Almeida, D. G., Soares da Silva, R. d. C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., et Sarubbo, L. A. (2017). Response surface methodology for optimizing the production of biosurfactant by *Candida tropicalis* on industrial waste substrates. *Frontiers in Microbiology*, 8, 157. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00157>
- Banat, I. M., Makkar, R. S., et Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 495-508. DOI [10.1007/s002530051648](https://doi.org/10.1007/s002530051648)
- Banat, I. M., Satpute, S. K., Cameotra, S. S., Patil, R., et Nyayanit, N. V. (2014). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 697. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00697>
- Banat, I. M., et Thavasi, R. (2019). *Microbial biosurfactants and their environmental and industrial applications*. CRC Press Boca Raton, FL, USA.
- Bonmatin, J.-M., Lapr evote, O., et Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial chemistry et high throughput screening*, 6(6), 541-556. <https://doi.org/10.2174/138620703106298716>
- Bordas, F., et Lafrance, P. (2001). Utilisation de biosurfactants (rhamnolipides) pour le traitement d'un sol sableux contamin e par le pyrène. *Essais en colonnes de sol. Etude et gestion des sols*, 8(3), 181-188. <https://espace.inrs.ca/id/eprint/9636>
- Chauhan, V., Mazumdar, S., Pandey, A., et Kanwar, S. S. (2023). *Pseudomonas* lipopeptide: An excellent biomedical agent. *MedComm–Biomaterials and Applications*, 2(1), e27. <https://doi.org/10.1002/mba2.27>
- Cheng, K. C., Khoo, Z. S., Lo, N. W., Tan, W. J., et Chemmangattuvalappil, N. G. (2020). Design and performance optimisation of detergent product containing binary mixture of anionic-nonionic surfactants. *Heliyon*, 6(5). [10.1016/j.heliyon.2020.e03861](https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03861)
- CIS. (2023). Canadian Industry Statistics, Soap and cleaning compound manufacturing - 32561. <https://ised-isde.canada.ca/app/ixb/cis/summary-sommaire/32561>
- Cooper, D. G., et Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53(2), 224-229. <https://doi.org/10.1128/aem.53.2.224-229.1987>
- Dabaghi, S., Ataei, S. A., et Taheri, A. (2023). Production of rhamnolipid biosurfactants in solid-state fermentation: process optimization and characterization studies. *BMC biotechnology*, 23(1), 2. DOI : [10.1186/s12896-022-00772-4](https://doi.org/10.1186/s12896-022-00772-4)
- Daniel, H.-J., Reuss, M., et Syltatk, C. (1998). Production of sophorolipids in high concentration from deproteinized whey and rapeseed oil in a two stage fed batch process using *Candida bombicola* ATCC 22214 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 20509. *Biotechnology Letters*, 20, 1153-1156. DOI : [10.1023/A:1005332605003](https://doi.org/10.1023/A:1005332605003)
- De Almeida, D. G., Soares Da Silva, R. d. C. F., Luna, J. M., Rufino, R. D., Santos, V. A., Banat, I. M., et Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1718. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01718>

- Detournay, S. (2023). Étude de la synergie entre certains lipopeptides sur leur activité cytotoxique et leur activité antivirale. <http://hdl.handle.net/2268.2/18243>. <http://hdl.handle.net/2268.2/18243>
- Dias, M. A. M., et Nitschke, M. (2023). Bacterial-derived surfactants: an update on general aspects and forthcoming applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 103-123. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00905-7>
- Ehrhardt, D., Secato, J., et Tambourgi, E. B. (2015). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using the residue from processing of pineapple, enriched with glycerol, as substrate. *Chemical engineering transactions*. <https://doi.org/10.3303/CET1543047>
- Elshafie, A. E., Joshi, S. J., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Bemani, A. S., Al-Bahry, S. N., Al-Maqbali, D. a., et Banat, I. M. (2015). Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1324. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01324>
- Emmert, E. A., et Biosafety, A. T. C. o. L. (2013). Biosafety guidelines for handling microorganisms in the teaching laboratory: development and rationale. *Journal of microbiology et biology education*, 14(1), 78-83. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v14i1.531>
- Fontoura, I. C. C. d., Saikawa, G. I. A., Silveira, V. A. I., Pan, N. C., Amador, I. R., Baldo, C., Rocha, S. P. D. d., et Celligoi, M. A. P. C. (2020). Antibacterial activity of sophorolipids from *Candida bombicola* against human pathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 63, e20180568. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020180568>
- Fox, S. L., et Bala, G. A. (2000). Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource technology*, 75(3), 235-240. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00059-6)
- George, S., et 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. <https://doi.org/10.1111/jam.12069>
- Ginésy, M., Rusanova-Naydenova, D., et Rova, U. (2017). Tuning of the Carbon-to-Nitrogen Ratio for the Production of L-Arginine by *Escherichia coli*. *Fermentation*, 3(4), 60. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040060>
- Godard, J. (2020). Valorisation de sous-produits végétaux par fermentation pour la production de composés à valeur ajoutée: Production d'acide L-lactique par fermentation de pulpe de carottes Université de Lyon]. <https://theses.hal.science/tel-03394662>
- Gong, G., Zheng, Z., Chen, H., Yuan, C., Wang, P., Yao, L., & Yu, Z. (2009). Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* E8 mutant obtained by ion beam implantation. *Food technology and biotechnology*, 47(1), 27-31. <https://hrcak.srce.hr/33048>
- Green, L. H., et Goldman, E. (2021). *Practical Handbook of Microbiology Fourth Edition*. <https://doi.org/10.1201/9781003099277>
- Griffin, W. C. (1949). Classification of surface-active agents by "HLB". *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 1, 311-326.
- Gudiña, E. J., et Teixeira, J. A. (2022). *Bacillus licheniformis*: the unexplored alternative for the anaerobic production of lipopeptide biosurfactants? *Biotechnology Advances*, 60, 108013. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108013>
- Hanen, B., et Nasri, M. (2016). Les lipopeptides de *Bacillus*: des molécules bioactives à structure particulière et à forte potentialité d'application [Bacillus lipopeptides: bioactives molecules with particular structure and high application potential]. *Nutrition et Santé*. <https://doaj.org/article/b5525b51e72a43c6a3b4b9b2cda4dd54>

- Hellmuth, H., et Dreja, M. (2016). Understanding interactions of surfactants and enzymes: Impact of individual surfactants on stability and wash performance of protease enzyme in detergents. *Tenside Surfactants Detergents*, 53(5), 502-508. <https://doi.org/10.3139/113.110447>
- Jahan, R., Bodratti, A. M., Tsianou, M., et Alexandridis, P. (2020). Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 275, 102061. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2019.102061>
- Jimoh, A. A., et Lin, J. (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 184, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>
- Johnson, P., Trybala, A., Starov, V., et Pinfield, V. J. (2021). Effect of synthetic surfactants on the environment and the potential for substitution by biosurfactants. *Advances in Colloid and Interface Science*, 288, 102340. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102340>
- Joice, P. A., et Parthasarathi, R. (2014). Optimization of biosurfactant production from *Pseudomonas aeruginosa* PBSC1. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 3, 140-151.
- Joshi, S. J., Al-Wahaibi, Y. M., Al-Bahry, S. N., Elshafie, A. E., Al-Bemani, A. S., Al-Bahri, A., et Al-Mandhari, M. S. (2016). Production, characterization, and application of *Bacillus licheniformis* W16 biosurfactant in enhancing oil recovery. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1853. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01853>
- Kanlayavattanakul, M., et Lourith, N. (2010). Lipopeptides in cosmetics. *International journal of cosmetic science*, 32(1), 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2009.00543.x>
- Kashif, A., Rehman, R., Fuwad, A., Shahid, M. K., Dayarathne, H., Jamal, A., Aftab, M. N., Mainali, B., et Choi, Y. (2022). Current advances in the classification, production, properties and applications of microbial biosurfactants—A critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 102718. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102718>
- Kezrane, I., Harouna, B. M., Hamadache, M., Benkortbi, O., et Amrane, A. (2020). Use of hydrocarbons sludge as a substrate for the production of biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Environmental monitoring and assessment*, 192, 1-16. DOI : [10.1007/s10661-020-08269-3](https://doi.org/10.1007/s10661-020-08269-3)
- Kokou, A., Simon, B., et al. (2023). Biotechnologie environnementale : milieux de culture. In (Cours ETE 415 - Biotechnologie Environnementale - Hiver 2023 ed., pp. 45). INRS. In.
- Konishi, M., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Uemura, S., Iwabuchi, H., et Kitamoto, D. (2018). Efficient production of acid-form sophorolipids from waste glycerol and fatty acid methyl esters by *Candida floricola*. *Journal of Oleo Science*, 67(4), 489-496. <https://doi.org/10.5650/jos.ess17219>
- Kronberg, B., Holmberg, K., et Lindman, B. (2014). *Surface chemistry of surfactants and polymers*. John Wiley et Sons.
- Kumar, A. P., Janardhan, A., Viswanath, B., Monika, K., Jung, J.-Y., et Narasimha, G. (2016). Evaluation of orange peel for biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* and their ability to degrade naphthalene and crude oil. *3 Biotech*, 6(1), 1-10. DOI : [10.1007/s13205-015-0362-x](https://doi.org/10.1007/s13205-015-0362-x)
- Kurek, M., et Benbettaieb, N. (2022). Matériaux biosourcés et biodégradables. *Matériaux et procédés d'emballage pour les industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques* (ISTE Edition, p. 169-208). <https://books.google.be/books>.
- Kuyukina, M. S., et Ivshina, I. B. (2019). Production of trehalolipid biosurfactants by *Rhodococcus*. *Biology of rhodococcus*, 271-298. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11461-9_10

- Le Guenic, S., Chaveriat, L., Lequart, V., Joly, N., et Martin, P. (2019). Renewable surfactants for biochemical applications and nanotechnology. *Journal of Surfactants and Detergents*, 22(1), 5-21. <https://doi.org/10.1002/jsde.12216>
- Lee, D. W., Lee, H., Kwon, B.-O., Khim, J. S., Yim, U. H., Kim, B. S., et Kim, J.-J. (2018). Biosurfactant-assisted bioremediation of crude oil by indigenous bacteria isolated from Taean beach sediment. *Environmental pollution*, 241, 254-264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.070>
- Makkar, R. S., Cameotra, S. S., et Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB express*, 1, 1-19. DOI : [10.1186/2191-0855-1-5](https://doi.org/10.1186/2191-0855-1-5)
- Mandalenaki, A., Kalogerakis, N., et Antoniou, E. (2021). Production of high purity biosurfactants using heavy oil residues as carbon source. *Energies*, 14(12), 3557. <https://doi.org/10.3390/en14123557>
- Markande, A. R., Patel, D., et Varjani, S. (2021). A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource technology*, 330, 124963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>
- Massarweh, O., et Abushaikha, A. S. (2020). The use of surfactants in enhanced oil recovery: A review of recent advances. *Energy Reports*, 6, 3150-3178. <https://doi.org/10.1016/j.egyr.2020.11.009>
- Mercaldi, M. P., Dams-Kozłowska, H., Panilaitis, B., Joyce, A. P., et Kaplan, D. L. (2008). Discovery of the dual polysaccharide composition of emulsan and the isolation of the emulsion stabilizing component. *Biomacromolecules*, 9(7), 1988-1996. DOI : [10.1021/bm800239p](https://doi.org/10.1021/bm800239p)
- Mohanty, S. S., Koul, Y., Varjani, S., Pandey, A., Ngo, H. H., Chang, J.-S., Wong, J. W., et Bui, X.-T. (2021). A critical review on various feedstocks as sustainable substrates for biosurfactants production: a way towards cleaner production. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 120. DOI: [10.1186/s12934-021-01613-3](https://doi.org/10.1186/s12934-021-01613-3)
- Mohd-Setapar, S. H., John, C. P., Mohd-Nasir, H., Azim, M. M., Ahmad, A., et Alshammari, M. B. (2022). Application of nanotechnology incorporated with natural ingredients in natural cosmetics. *Cosmetics*, 9(6), 110. <https://doi.org/10.3390/cosmetics9060110>
- Morita, T., Konishi, M., Fukuoka, T., Imura, T., et Kitamoto, D. (2008). Production of glycolipid biosurfactants, mannosylerythritol lipids, by *Pseudozyma siamensis* CBS 9960 and their interfacial properties. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(5), 493-502. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.493>
- Moshtagh, B., Hawboldt, K., et Zhang, B. (2019). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* N3-1P using the brewery waste as the carbon source. *Environmental technology*. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1473502>
- Moshtagh, B., Hawboldt, K., et Zhang, B. (2021). Biosurfactant production by native marine bacteria (*Acinetobacter calcoaceticus* P1-1A) using waste carbon sources: Impact of process conditions. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 99(11), 2386-2397. <https://doi.org/10.1002/cjce.24254>
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2), 183-198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>
- Nardello-Rataj, V., et Ho Tan Tai, L. (2006). Formulation des détergents: Produits d'entretien des articles textiles. *Techniques de l'ingénieur. Génie des procédés*(J2280).
- Nazareth, T. C., Zanutto, C. P., Maass, D., de Souza, A. A. U., et Ulson, S. M. d. A. G. (2021). Bioconversion of low-cost brewery waste to biosurfactant: an improvement of surfactin production by culture medium optimization. *Biochemical Engineering Journal*, 172, 108058. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108058>

- Nielsen, T., Thrane, C., Christophersen, C., Anthoni, U., et Sørensen, J. (2000). Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin—a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Journal of applied microbiology*, 89(6), 992-1001. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01201.x>
- Nitschke, M., Ferraz, C., et Pastore, G. M. (2004). Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 81-85. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100013>
- Noiret, N., Benvegna, T., et Plusquellec, D. (2002). Tensioactifs à base de substances renouvelables. *Actualité Chimique*(11/12), 70-75.
- Pal, S., Chatterjee, N., Das, A. K., McClements, D. J., et Dhar, P. (2023). Sophorolipids: A comprehensive review on properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 313, 102856. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.102856>
- Plaza, G., Chojniak, J., Rudnicka, K., Paraszkiwicz, K., et Bernat, P. (2015). Detection of biosurfactants in *Bacillus* species: genes and products identification. *Journal of applied microbiology*, 119(4), 1023-1034. <https://doi.org/10.1111/jam.12893>
- Redon, A. (2019). Bio-based surfactants. In *Adebiotech – Sup’Biotech* (pp. 1-23).
- Reis, F. A., Sérvulo, E. F. C., et De França, F. P. (2004). Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. *Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO*,
- Rieger, M. M. (2020). Surfactants. In *Pharmaceutical Dosage Forms* (pp. 211-286). CRC Press.
- Roelants, S., Van Renterghem, L., Maes, K., Everaert, B., Redant, E., Vanlerberghe, B., Demaeseneire, S. L., et Soetaert, W. (2019). Microbial biosurfactants: from lab to market. *Banat, Im; Thavasi, R. Microbial Biosurfactants and their Environmental and Industrial Applications*, 1, 340-362.
- Rolland, H., et Milius, A. (2016). Les tensioactifs biosourcés pour la cosmétique. *l’actualité chimique*(412).
- Safer, A. (2018). Introduction à la chimie des surfaces. <http://dspace.univ-usto.dz/handle/123456789/324>
- Santos, D. K. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Santos, V. A., et Sarubbo, L. A. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401. <https://doi.org/10.3390/ijms17030401>
- Singh, P., Patil, Y., et Rale, V. (2019). Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of applied microbiology*, 126(1), 2-13. <https://doi.org/10.1111/jam.14057>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., et Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*, 6, 1-15. DOI: [10.1007/s13205-016-0485-8](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8)
- Smyth, T. J. P., Perfumo, A., McClean, S., Marchant, R., et Banat*, I. M. (2010). Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 3687-3704). https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_290
- Sun, S., Wang, Y., Zang, T., Wei, J., Wu, H., Wei, C., Qiu, G., et Li, F. (2019). A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginosa* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresource technology*, 281, 421-428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.087>
- Takahashi, M., Morita, T., Wada, K., Hirose, N., Fukuoka, T., Imura, T., et Kitamoto, D. (2011). Production of sophorolipid glycolipid biosurfactants from sugarcane molasses using *Starmerella bombicola* NBRC 10243. *Journal of Oleo Science*, 60(5), 267-273. <https://doi.org/10.5650/jos.60.267>

- Thaniyavarn, J., Roongsawang, N., Kameyama, T., Haruki, M., Imanaka, T., Morikawa, M., et Kanaya, S. (2003). Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2. 2. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(6), 1239-1244. <https://doi.org/10.1271/bbb.67.1239>
- Varjani, S. J., et Upasani, V. N. (2017). Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresource technology*, 232, 389-397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>
- Vijayakumar, S., et Saravanan, V. (2015). Biosurfactants-types, sources and applications. *Res J Microbiol*, 10(5), 181-192. <https://scialert.net/abstract/?doi=jm.2015.181.192>
- Yangxin, Y., Jin, Z., et Bayly, A. E. (2008). Development of surfactants and builders in detergent formulations. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 16(4), 517-527. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(08\)60115-9](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(08)60115-9)
- Zou, C., Wang, M., Xing, Y., Lan, G., Ge, T., Yan, X., et Gu, T. (2014). Characterization and optimization of biosurfactants produced by *Acinetobacter baylyi* ZJ2 isolated from crude oil-contaminated soil sample toward microbial enhanced oil recovery applications. *Biochemical Engineering Journal*, 90, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.007>

8 ANNEXES

8.1 Composition des milieux semi-synthétiques

Tableau 8-1 Souches sélectionnées – numéro ATCC et composition de leur MSS de croissance

Souche et numéro ATCC	<i>Starmerella bombicola</i> ATCC 22214	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Composition MSS (g/L)	Extrait de levure 3 Extrait de malt 3 Dextrose 10 Peptone 5	Extrait de bœuf 3 Peptone 5			Extrait de bœuf 3 Peptone 5 Ou Extrait de levure 2,5 Tripticase peptone 1	Pommes de terre en dés 300 Glucose 20 Ou Amidon de maïs 20 Glucose 20

8.2 Choix et composition des milieux résiduaux

Tableau 8-2 Première réception de MRF pour les travaux de production de BS

MRF	Désignation	pH	ST (g/L)	MES (g/L)	Concentration (g/L)						
					Glucose	Fructose	Lactose	Sucrose	Galactose	Xylose	Tréhalose
Eaux usées d'industries d'amidon	Starch industrial wastewater (SIW)	3,99	13,2	4,44	31,9	11,4	9,1	6,4	8,7	7,6	5,7
Boues activées de l'usine de pâtes et papiers de Kruger	Kruger	6,65	10,3	9,4	1,9	1,5	0,83	0,97	1,4	1,1	0,53
Eaux usées d'industries de brasserie	Filtration	5,62	1,6	1,08	0,12	0,025	0,005	0,015	0,025	0,005	0,005
	Brewery fermentation wastewater (BFW)	5,33	69,0	13,5	0,96	0,38	0,65	0,15	0,3	0,7	1,3
	Brewery distillation sludge (BDS)	5,62	12,0	5,6	16,7	15,0	8,3	8,3	14,3	9,5	8,3

8.3 Revitalisation et stockage des microorganismes

- Préparation des bouillons et géloses nutritives pour une souche donnée avec son MSS.
- Préparation du matériel nécessaire.

8.3.1 *Revitalisation*

- Avant toute manipulation, nettoyer la hotte avec de l'alcool à 95° et allumer UV pendant 15 min.
- Ouvrir de façon stérile le flacon de la souche à revitaliser.
- Préparer un tube contenant 5 à 6 mL de bouillon nutritif.
- Prélever environ 0,5 à 1,0 mL du bouillon contenu dans le tube avec une pipette stérile et réhydrater l'ensemble du culot.
- Transférer de façon aseptique cette aliquote dans le tube de bouillon et bien mélanger (ne pas mélanger au vortex).
- Couler la gélose nutritive dans des boites de pétri.
- Utiliser plusieurs gouttes de la suspension pour inoculer une gélose et/ou une plaque et incubé pendant 24 h à l'étuve à 37°C (permet d'avoir des souches pures qui seront utilisées pour les fermentations pendant 1 mois maximum).
- Transférer le reste de la suspension dans des flacons (erlenmeyers) contenant 15 mL de bouillon nutritif (faire des duplicatas) : donc chaque flacon contenant 15 mL de bouillon et environ 3 mL de suspension.
- Incuber les erlenmeyers sur un agitateur rotatif à la température optimale de la souche à 180 rpm pendant 1 à 3 jours.
- Après incubation, récupérer les bouillons fermentés pour faire la conservation au glycérol.

8.3.2 *Conservation au glycérol*

- Stériliser 50 à 100 mL de glycérol pur (99,5%) et des embouts (tips) de 0,5 mL à l'autoclave (121 °C pendant 15 min).
- Sous la hotte, préparer 10 vials contenant 0,5 mL de glycérol.
- Dans chaque vials, ajouter 0,5 mL du bouillon fermenté (faire 5 vials pour chaque flacon).
- Mélanger en secouant (ne pas mélanger au vortex).
- Conserver les vials à 4°C pendant 24 h, puis à -20°C pendant 24 h et enfin à -80°C. Ces vials seront gardés pendant 6 mois maximum. Après 6 mois, repartir des vials pour refaire une

régénération (comme décrit dans la « procédure de revitalisation » et préparer un autre stock de glycérol.

8.4 Fermentations de *Bacillus licheniformis* et *Starmarella bombicola* sur MSS

Tableau 8-3 Croissance cellulaire et extractions sur MSS

Souches microbiennes	Croissance cellulaire (UFC/mL)		Extrait de BS (g/L)					
	24 h de fermentation	48 h de fermentation	Méthode 1 : Précipitation HCl		Méthode 2 : Précipitation HCl + extraction acétate d'éthyle/méthanol		Méthode 3 : Précipitation HCl + extraction chloroforme/méthanol	
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	9,15E+06	1,70E+07	0,37	1,07	1,49	3,84	0,30	1,74
<i>Starmarella bombicola</i> ATCC 22214	1,56E+09	1,45E+09	8,17	8,40	1,11	1,72	3,35	3,89

8.5 Fermentations en erlenmeyers avec milieux SIW, Kruger, BFW et BDS

8.5.1 *Starmerella bombicola* ATCC 22214

Tableau 8-4 Fermentations en erlenmeyers de *Starmerella bombicola* avec un inoculum de 2 et 5%

Temps de fermentation (h)	SIW 2%				SIW 5%				Kruger 2%				Kruger 5%			
	CFU/mL	log ₁₀ (CFU/mL)	pH lu	pH ajusté	CFU/mL	log ₁₀ (CFU/mL)	pH lu	pH ajusté	CFU/mL	log ₁₀ (CFU/mL)	pH lu	pH ajusté	CFU/mL	log ₁₀ (CFU/mL)	pH lu	pH ajusté
0	1,09E+06	6,04	7,31	-	3,45E+06	6,54	7,28	-	1,88E+06	6,27	7,14	-	5,10E+06	6,71	7,05	-
6	1,63E+06	6,21	7,54	6,82	4,90E+06	6,69	7,51	-	2,28E+06	6,36	7,20	6,89	4,55E+06	6,66	7,10	6,78
9	2,72E+06	6,43	6,99	-	1,07E+07	7,03	6,95	-	4,20E+06	6,62	6,99	6,92	1,13E+07	7,05	6,49	7,10
12	4,65E+06	6,67	7,07	-	1,62E+07	7,21	6,93	-	4,30E+06	6,63	7,01	-	1,43E+07	7,15	6,41	7,05
24	9,80E+07	7,99	6,50	6,98	2,73E+08	8,44	6,42	6,82	1,27E+07	8,54	7,23	-	4,45E+08	8,65	7,55	7,08
32	2,74E+08	8,44	6,07	6,82	5,15E+08	8,71	5,18	7,03	3,45E+08	8,54	7,44	6,92	2,90E+08	8,46	7,76	6,84
48	2,46E+08	8,39	6,57	-	2,94E+08	8,47	6,40	-	2,67E+08	8,43	7,83	-	2,31E+08	8,36	7,89	-

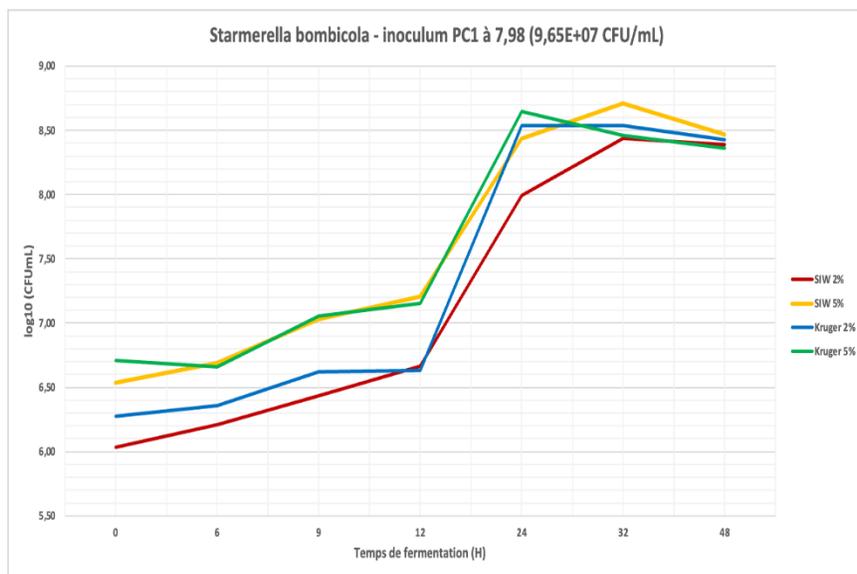


Figure 8.1 Courbes de croissance de *Starmerella bombicola* avec SIW et Kruger 2 et 5%

Tableau 8-5 Mesures de TS du surnageant pour *Starmerella bombicola*

MRF	TS (dyn/cm ou mN/m)
	48 h
SIW 2%	66,11
SIW 5%	53,68
Kruger 2%	70,88
Kruger 5%	69,78

Tableau 8-6 Extraction par HCl de *Starmerella bombicola*

MRF	Composés extracellulaires (g/L de bouillon de culture)	
	24 h	48 h
SIW 2%	0,128	0,636
SIW 5%	0,113	0,534
Kruger 2%	0,152	0,310
Kruger 5%	0,114	0,515

8.5.2 *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Tableau 8-7 Fermentations en erlenmeyers de *Bacillus subtilis* avec un inoculum de 2 et 5%

Temps de fermentation (h)	SIW 2%				SIW 5%				Kruger 2%				Kruger 5%			
	CFU/mL	Log ₁₀ (CFU/mL)	pH lu	pH ajusté	CFU/mL	Log ₁₀ (CFU/mL)	pH lu	pH ajusté	CFU/mL	Log ₁₀ (CFU/mL)	pH lu	pH ajusté	CFU/mL	Log ₁₀ (CFU/mL)	pH lu	pH ajusté
0	5,10E+04	4,71	7,43	-	1,75E+05	5,24	6,89	-	4,75E+04	4,68	7,70	-	2,00E+05	5,30	7,82	-
6	5,25E+05	5,72	7,09	-	2,95E+06	6,47	6,75	7,07	1,20E+03	3,08	7,53	7,17	2,50E+05	5,40	7,47	7,19
9	4,35E+05	5,64	6,60	6,92	1,57E+06	6,19	6,63	6,88	3,00E+03	3,48	7,38	6,96	1,30E+04	4,11	7,28	7,07
12	7,45E+05	5,87	6,72	6,93	2,63E+06	6,42	6,79	7,20	1,10E+04	4,04	7,21	6,91	3,10E+04	4,49	7,23	6,94
24	1,70E+06	6,23	6,66	7,13	3,00E+06	6,48	6,80	7,16	8,25E+06	6,92	7,18	6,9	2,48E+07	7,39	7,26	6,87
32	3,65E+06	6,56	6,64	7,04	4,85E+06	6,69	6,80	7,09	5,80E+07	7,76	7,63	7,02	6,20E+07	7,79	7,49	7,04
48	4,35E+07	7,64	7,05	-	2,62E+07	7,42	7,14	-	6,70E+07	7,83	7,42	6,95	3,90E+08	8,59	7,67	7,00

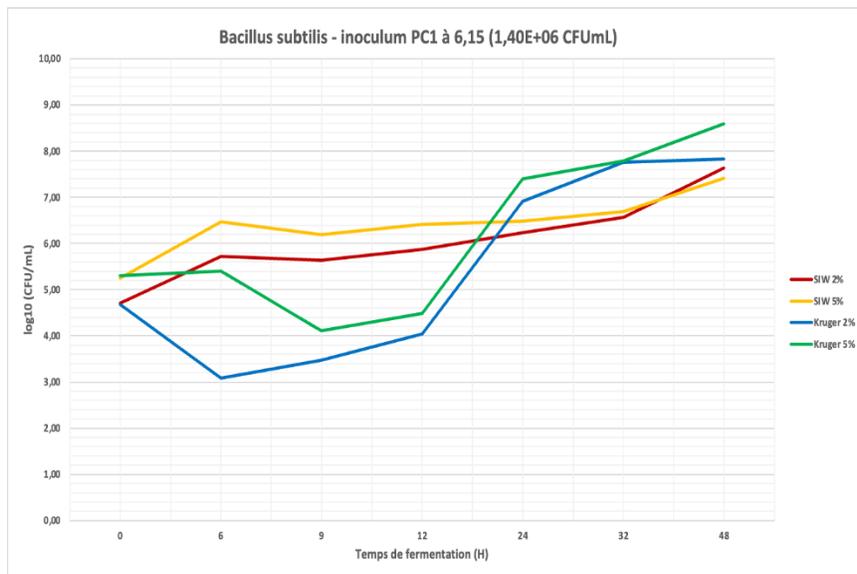


Figure 8.2 Courbes de croissance cellulaire de *Bacillus Subtilis* avec un inoculum de 2 et 5% (v/v)

8.5.3 *Bacillus licheniformis* ATCC 14580

Tableau 8-8 Données de fermentations en erlenmeyers et suivi pH de *Bacillus licheniformis*

Temps de fermentation (h)	SIW 5%		Kruger 5%		BFW 5%		BFW 5%	
	CFU/mL	log10 (CFU/mL)	CFU/mL	log10 (CFU/mL)	CFU/mL	log10 (CFU/mL)	CFU/mL	log10 (CFU/mL)
0	1,07E+08	8,03	9,60E+07	7,98	9,40E+07	7,97	4,20E+07	7,62
3	3,78E+08	8,58	5,46E+08	8,74	1,52E+07	7,18	4,10E+05	5,61
6	7,00E+07	7,85	1,16E+08	8,06	-	-	-	-
9	5,60E+07	7,75	1,20E+07	7,08	-	-	1,11E+05	5,05
12	4,70E+08	8,67	-	-	-	-	-	-
24	2,95E+09	9,47	9,50E+08	8,98	-	-	-	-
48	9,30E+08	8,97	1,31E+09	9,12	1,70E+06	6,23	2,40E+05	5,38

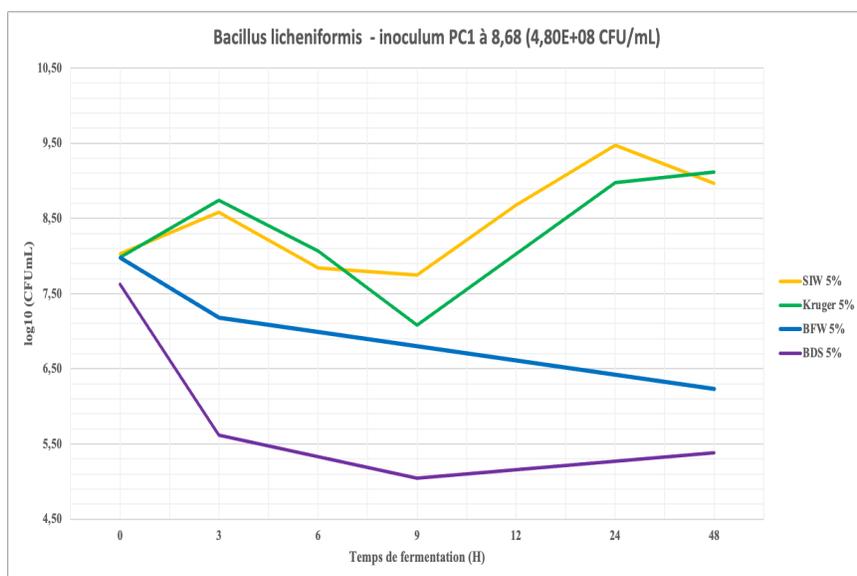


Figure 8.3 Courbes de croissance cellulaire de *Bacillus licheniformis* avec un inoculum de 5% (v/v)

Tableau 8-9 Extraction par HCl de *Bacillus licheniformis*

MRF	Composés extracellulaires (g/L de bouillon de culture)	
	24 h	48 h
SIW 2%	0,40	0,62
Kruger 2%	1,41	0,82

8.6 Fermentation en bioréacteur de 150 L par *Starmerella bombicola*

Tableau 8-10 Paramètres opératoires en bioréacteur de 150 L lors de la fermentation avec *Starmerella bombicola*

Bioréacteur 150 L	ST MRF (SIW) (g/L)	% Inoculum (PC1 et PC2 pendant 24 h)	Température (°C)	pH	Temps de fermentation
Volume final (VF) 90 L	20	PC1: 3,5% PC2 : 110 mL PC1 (MSS) + 3,04 L PC2 (SIW)	25	6,2 +/- 0,2 au début; Pas de contrôle pendant les 48 h	48 h
		VF : 3,15 L de PC2 + 86,85 L SIW			

Tableau 8-11 Comparaison des résultats obtenus en bioréacteurs de 5L et 150 L lors de la fermentation avec *Starmerella bombicola*

Échantillons	Extrait (précipitation par HCl 6N à pH 2) (g/L bouillon)		IE ₂₄ (%)				IF Tension (dyn/cm)			
			Surnageant brut		Rétentat (concentré membrane 2K)		Surnageant brut		Rétentat (concentré membrane 2K)	
	5 L	150 L	5 L	150 L	5 L	150 L	5 L	150 L	5 L	150 L
12 h	0,60	0,34	1	0	1	0	52,33	61,27	53,33	60,74
24 h	0,41	0,89	0	0	0	1	53,20	60,97	52,90	59,34
48 h (centri labo)	1,33	1,56	30	15	37	5	49,19	56,30	48,37	54,09
48 h (surnageant avec centri pilote)	-	-	-	1	-	12		61,0	-	59,26

8.7 Concentration des surnageants avec membranes 1K et 2K

La concentration des surnageants de fermentation est une ultrafiltration faite par des membranes avec un seuil de coupure (MWCO) de 1K et 2 K. dont le principe est le suivant :

- Sélectionner la membrane la plus appropriée pour l'échantillon. Choisir un MWCO au moins 50% plus petit que la taille moléculaire de l'espèce concernée.
- Remplir le concentrateur (membrane) avec le volume maximal de 2 mL; s'assurer que le couvercle est bien en place.
- Insérer le concentrateur dans une centrifugeuse d'angle fixe, centrifuger entre 4500 et 9000 rpm pendant 5 à 10 min.
- Récupérer le concentré (rétentat) et refaire une centrifugation du filtrat pour augmenter le taux de concentration.

Les analyses de recherches de BS sont effectuées sur les concentrés.



Figure 8.4 Membrane de concentration par ultrafiltration 1K et 2K

8.8 Caractérisation moléculaire des BS

La caractérisation est faite par une analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrophotométrie de masse (GC-MS). Il s'agit d'une séparation des composés de l'échantillon suivi de la détection et de l'identification en fonction de leur rapport de masse sur charge.

C'est une méthode qui permet d'identifier ou de quantifier de manière précise de nombreuses substances présentes en faible quantité voire en traces.

Pour nos échantillons, une analyse des surnageants bruts de fermentation à 0, 12, 24, 36, 48, 60 ou 72 h est réalisée. Les surnageants de MRF stérilisés (sans inoculum) constituent les témoins.

Des vials ou flacons d'échantillons (de 1 mL) sont injectés au chromatographe sont préparés pour chaque analyse (Figure 8.5).

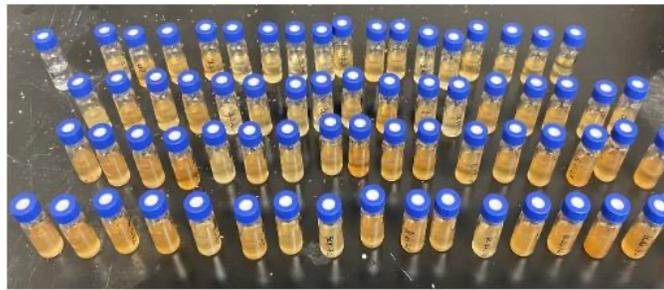


Figure 8.5 Préparation de vials en bioréacteurs de 5 L pour l'injection au GC-MS

8.9 Indices d'émulsification de quelques surfactants classiques

Tableau 8-12 IE_{24} de plusieurs bio surfactants à une fraction massique de 0,1 % dans une solution tampon Tris-HCl de 50 mM (pH=7,5) Gong et al., 2009)

Biosurfactants	$E_{24}/\%$
Crude surfactin sodium salt	68.0
Extracted surfactin sodium salt	69.1
SDS	71.7
Triton X-100	72.5
Tween 80	71.2
Organic silicon surfactant	69.1

8.10 Analyses CHNS

Tableau 8-13 Analyses CHNS des échantillons de SIW et Kruger utilisés en bioréacteurs de 5 L

	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
SIW	49,5	7,2	7,2	0,8
Kruger	29,6	3,1	3,1	0,9

Ratio C:N

SIW 9:1; Kruger 9:1