

Les biosurfactants, plus que jamais sollicités

Par Ibrahim M. Banat*

Les recherches sur les surfactants, agents utilisés comme émulsifiants ou dispersants, sont stimulées par les préoccupations écologiques. De nombreux microorganismes producteurs de surfactants biodégradables pourraient permettre, à l'avenir, de mieux lutter contre les pollutions.

* École de chimie et de biologie appliquées, université d'Ulster, Corelaine, Co Londonderry BT52 1SA, Irlande du Nord, Royaume-Uni.

(1) A. Shaw (1994) *Soap Cosm. Chem. Specialties* 70, 24-34.

(2) N. Kosaric et al. (1987) In : *Biosurfactants and biotechnology* (N. Kosaric, W. L. Cairns, N.C.C. Gray, eds), vol. 25, Surfactants Science Series, Marcel Dekker, New York, pp. 247-331.

(3) A.M. Chakrabarty (1985) *Trends Biotechnol.* 3, 32-38.

Qu'y a-t-il de commun entre la stabilisation d'une mayonnaise en tube, le nettoyage des conséquences d'une marée noire, la pénétration d'une crème cosmétique dans l'épiderme, ou, dans l'industrie papetière, l'élimination de la résine de la pulpe de bois ? Dans tous les cas, il s'agit de résoudre des problèmes de répulsion ou d'attraction moléculaire entre deux milieux aux propriétés physico-chimiques différentes comme, par exemple, l'eau et l'huile.

Depuis plusieurs décennies déjà, les industries de la peinture et des détergents ont élaboré une réponse en développant des produits actifs appelés surfactants. Ce sont des molécules dites amphiphiles qui comportent une partie polaire, donc hydrophile, et l'autre apolaire, donc hydrophobe. En se plaçant à l'interface de deux milieux non miscibles, elles réduisent la tension superficielle. De manière générale, toute industrie devant maîtriser des phénomènes d'émulsion, d'adhérence, de viscosité, d'extraction, de dispersion, de revêtement, etc. utilise des produits surfactants : chimie (peinture, colle, détergents), papier (préparation de la pulpe), cosmétique (émulsification et stabilisation des pommades),

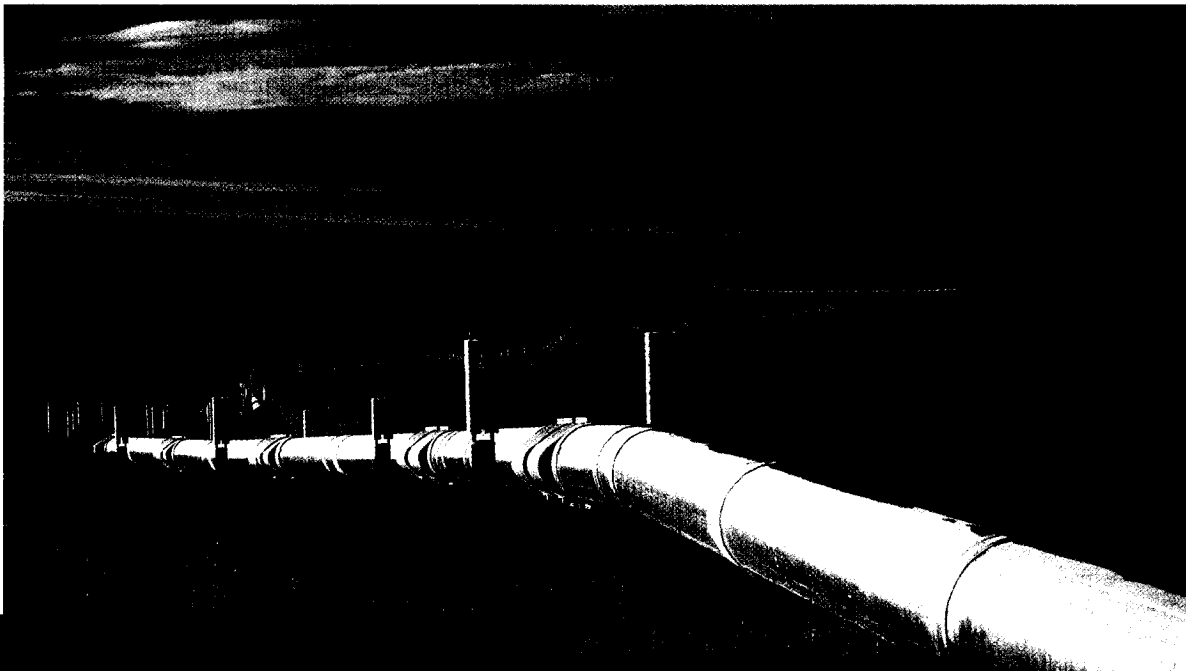
pharmacie (liposomes, lutte antimicrobienne), agrochimie (dispersion des produits phytosanitaires), agroalimentaire (agents de texture, solubilisation des arômes...), etc. Le marché mondial des surfactants, estimé à 9,4 milliards de dollars annuels en 1994, devrait donc continuer à croître (1).

Sans doute la plus grande consommatrice de surfactants, l'industrie pétrolière les utilise pour extraire le pétrole adsorbé sur la roche (*enhanced oil recovery*, EOR), pour diminuer sa viscosité afin de faciliter son transit dans les pipelines, pour nettoyer les réservoirs... ou pour tenter de réparer, autant que faire se peut, les dégâts qu'elle provoque de temps à autre en mer et sur terre. Les surfactants sont d'ailleurs de plus en plus sollicités pour la décontamination des milieux naturels : de nombreux composés polluants, adsorbés sur leur substrat, sont en effet difficiles à extraire, car non solubles dans l'eau. C'est le cas des hydrocarbures, et des molécules organiques non polaires en général, mais aussi des métaux. Les surfactants de synthèse actuellement utilisés risquent cependant de poser autant de problèmes environnementaux qu'ils en résolvent : pour la plupart dérivées

du pétrole, ces molécules sont en général toxiques et extrêmement persistantes dans les milieux naturels, car non biodégradables. En outre, leur efficacité diminue dans des conditions physiques extrêmes de température, pH ou salinité.

Or, au cours des années 1980, des équipes telles que celle de Naim Kosaric, à l'université du Western Ontario (London, Canada), ou d'Ananda Chakrabarty, au Centre de recherche, de développement et d'ingénierie chimique de l'armée américaine à Aberdeen (Maryland, États-Unis), se sont intéressées à des microorganismes utilisant des hydrocarbures comme seule source de carbone pour leur croissance, et ont découvert qu'ils libèrent leurs propres agents surfactants dans le milieu (2, 3). En facilitant la désorption des nutriments de la matrice du sol, ou leur dispersion dans l'eau, ces « biosurfactants » en améliorent l'accès, conférant ainsi un avantage compétitif aux souches microbiennes qui les sécrètent. Ces dernières années, la recherche sur les biosurfactants a explosé, sous les effets conjugués des progrès de la biotechnologie, d'une prise de conscience accrue des enjeux écologiques et de la probable émergence de législations environnementales plus strictes. Aussi efficaces que leurs homologues chimiques, les biosurfactants présentent en effet l'avantage d'être biodégradables et non toxiques. De plus, certains d'entre eux, sécrétés par des organismes extrêmophiles, restent fonctionnels malgré des conditions drastiques de température, de salinité ou de pH.

De nombreux microorganismes producteurs de biosurfactants ont déjà été isolés, sécrétant diverses classes des



© ALASKA STOCK/SUNSET

De nombreuses industries, pétrolière, chimique, cosmétique, agroalimentaire, utilisent des « surfactants » pour maîtriser les phénomènes d'émulsion, d'adhérences, de viscosité... de leur produit.

tré des propriétés antibiotiques, peut-être dues à leur capacité à désorganiser la membrane lipidique des cellules. Ils interviendraient alors comme une « arme » dans la compétition pour la nourriture.

> Deux espèces bien connues

La régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, les deux bactéries productrices les plus étudiées. La première sécrète des rhamnolipides – molécules formées d'un rhamnose et d'un alcane à douze atomes de carbone – nécessaires à sa croissance lorsqu'elle est cultivée sur un milieu d'hydrocarbures (5, 6). Certains laboratoires ont rapporté une augmentation de la production lorsque l'apport de phosphates est limité, ou lorsque l'azote disparaît du milieu (7, 8).

Pour sa part, *B. subtilis* produit une molécule connue depuis de nombreuses années : la surfactine, un peptidolipide formé d'un heptapeptide cyclique lié à un acide gras à 13 ou 15 atomes de carbone (9). Les conditions optimales de sa production ont été soigneusement déterminées, et, fait inhabituel, la présence d'hydrocarbures dans le milieu de culture en inhibe la synthèse (10, 11). Ses propriétés antivirales et antibactériennes constituent peut-être un indice de sa fonction en conditions naturelles (12).

Les gènes responsables de la synthèse de ces deux molécules ont été isolés et séquencés (13). On a découvert à cette occasion que, tant chez *P. aeruginosa* que chez *B. subtilis* – et donc probablement chez d'autres espèces productrices moins étudiées – la sécrétion de biosurfactant est régulée par le *quorum sensing*, un mécanisme

(4) J.D. Desai, I.M. Banat (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 47-64.

(5) M. Robert *et al.* (1989). *Biotech. Lett.* 11, 871-874.

(6) G.S. Shrive *et al.* (1995) *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* 4, 331-337.

(7) C.N. Mulligan *et al.* (1989) *J. Biotech.* 12, 199-210.

(8) R.K. Venkata, N.G. Karanth (1989) *J. Chem. Techn. Biotech.* 45, 249-257.

(9) A. Kakinuma *et al.* (1969) *Agr. Biol. Chem.* 33, 973-976.

(10) R. Sen, T. Swaminathan (1997) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 358-363.

(11) D.G. Cooper *et al.* (1981) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 408-412.

(12) D. Vollenbroich *et al.* (1997) *Biologicals* 25, 289-297.

(13) E.R. Sullivan (1998) *Current Opin. Biotechnol.* 9, 263-269.

•••

1 - Quelques exemples de microorganismes producteurs de biosurfactants

Microorganisme	Biosurfactant	Microorganisme	Biosurfactant
<i>Arthrobacter</i> RAG-1	Hétéropolysaccharides	<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Phospholipides
<i>Arthrobacter</i> MIS38	Peptidolipides	<i>Corynebacterium lepus</i>	Acides gras
<i>Arthrobacter</i> sp.	Lipides de tréhalose, saccharose ou fructose	<i>Nocardia erythropolis</i>	Lipides neutres
<i>Bacillus licheniformis</i> JF-2	Peptidolipides	<i>Ochrobactrum anthropii</i>	Protéine
<i>Bacillus licheniformis</i> 86	Peptidolipides	<i>Penicillium spiculisporum</i>	Acide spiculosporique
<i>Bacillus subtilis</i>	Surfactine	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rhamnolipide
<i>Bacillus</i> sp. AB-2	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Peptidolipide
<i>Candida antarctica</i>	Lipide à mannosylérthritol	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Lipide glucidique
<i>Candida tropicalis</i>	Acides gras	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Trehalose dicorynomycolate
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Lipides neutres	<i>Rhodococcus</i> sp. ST-5	Glycolipide
		<i>Rhodococcus</i> sp. 33	Polysaccharide

● ● ●

(14) M.M. Yakimov, P.N. Golshin (1997) *Biotechnol. Prog.* 13, 757-761.

(15) U.A. Ochsner et al. (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3503-3506.

(16) T. Stachelhaus (1997) *Science* 269, 69-72.

(17) J. Ku et al. (1997) *Chem. Biol.* 4, 203-207.

(1) S. Harvey et al. (1994) *Bio. Tech.* 8, 228-230

(2) M. Tumeo et al. (1994) *Spill Sci. Technol. Bull.* 1, 53-59.

(3) Y. Zhang, R.M. Miller (1995) *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2247-2251.

(4) D.C. Herman et al. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3622-3627.

(5) G.Y. Bai et al. (1997) *J. Cont. Hydrol.* 25, 157-170.

(6) I.M. Banat et al. (1991) *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7, 80-84.

(7) E. Daziel et al. (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1908-1912.

(8) Y. Zhang et al. (1997) *Environ. Sci. Technol.* 31, 2211-2217.

(9) W.H. Noordman et al. (1998) *Environ. Sci. Technol.* 32, 1806-1812.

(10) T.R. Neu et al. (1990) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 518-520.

(11) P.J. Vater (1986) In: *Biosurfactants* (N. Kosaric, ed), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 419-446.

(12) H. Itokawa et al. (1994) *Chem. Pharm. Bull.* 42, 604-607.

(13) N. Kosaric (1996) In: *Biotechnology*, vol 6 VCH (H.J. Rehm et al., eds), Weinheim, New York, pp. 659-717.

(14) M.J. Brown (1991) *Int. J. Cosmet. Sci.* 13, 61-64.

me permettant aux bactéries de « surveiller » la densité de leur population (13). Plus récemment, l'équipe de Michael Yakimov et Kenneth Timmis, du Centre national de recherche pour la biotechnologie (Braunschweig, Allemagne), a séquencé les gènes responsables de la synthèse d'un autre peptidolipide, la lichenysine, chez *Bacillus licheniformis*, une bactérie récoltée dans des réservoirs de pétrole. Autre bactérie dégradant le pétrole, *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produit un émulsifiant de très haut poids

moléculaire, l'émulsan, formé d'un squelette polysaccharidique sur lequel se greffent des acides gras. Étant donné la complexité de cette molécule, on ne connaît pas encore tous les gènes intervenant dans sa production, même si deux d'entre eux, modulant l'activité émulsifiante d'*A. calcoaceticus*, ont été récemment séquencés (14). La connaissance des gènes codant les biosurfactants permettra de dépasser certaines limites de ces composés. Encore difficiles à produire, ils restent nettement plus chers que leurs homo-

logues chimiques. D'où l'idée de transférer les gènes de biosurfactants dans le génome de microorganismes facilement cultivables, éventuellement en les plaçant sous le contrôle de promoteurs très actifs. En 1995, l'équipe d'Urs Ochsner et Michael Vasil, à l'Institut fédéral suisse de biotechnologie (Zurich, Suisse), transférait ainsi avec succès les quatre gènes de *P. aeruginosa* responsables de la synthèse de rhamnolipides (*rhlA*, B, R et I) chez d'autres espèces de *Pseudomonas* (15). On peut également envisager de modifier la structure moléculaire

1 - Du traitement des marées noires... aux cosmétiques

Ces dernières années, des marées noires accidentelles – et parfois des relargages délibérés de pétrole – ont gravement pollué certains milieux océaniques et côtiers, par exemple en Alaska en 1989 (naufrage de l'Exxon Valdez), sur les côtes françaises fin 1999 (naufrage de l'Erika) ou à Istanbul (Turquie) plus récemment. À l'heure actuelle, la principale méthode de décontamination consiste à faire confiance aux microorganismes naturellement présents dans le milieu pour dégrader les hydrocarbures, éventuellement en ajoutant des produits dispersants... Les biosurfactants ou les souches bactériennes qui les produisent n'ont pas encore été utilisés *in situ*, mais la catastrophe de l'Exxon Valdez fut l'occasion de tester leur efficacité au laboratoire. L'équipe d'Ananda Chakrabarty a en effet prélevé des graviers contaminés sur les côtes d'Alaska afin de tester l'efficacité des rhamnolipides de *Pseudomonas aeruginosa* et optimiser leurs conditions d'utilisation. De manière générale, la présence de ces produits dans l'eau de lavage double, voire triple, la quantité de pétrole entraînée, tout en ramenant à une minute le temps de contact nécessaire (1). Travaillant sur les mêmes graviers, une équipe de l'université d'Alaska (Fairbanks, États-Unis) a constaté que les hydrocarbures à 20 ou 21 atomes de carbone sont totalement éliminés, et que 30 % des composés pétroliers semi-volatils disparaissent (2). De fait, de nombreuses expériences au laboratoire démontrent que les rhamnolipides de *P. aeruginosa* augmentent la mobilité – et donc la facilité d'extraction – d'hydrocarbures adsorbés sur des matrices solides comme de la terre ou des colonnes de sable (3-5). Les biosurfactants ayant démontré leur efficacité au laboratoire, l'idée est venue de les utiliser *in situ*. Une première stratégie consisterait à les produire à l'échelle industrielle dans des bioréacteurs, pour les injecter dans le puits. Elle requiert cependant de lourds investissements : installation de production, procédés de purification et d'injection. On peut également utiliser les microorganismes producteurs eux-mêmes, d'autant plus que leur action ne se limite pas à la synthèse de biosurfactants : ils produisent aussi des gaz et des acides, réduisent la viscosité du pétrole, le chassent mécaniquement en envahissant les pores de la roche et dégradent les grosses molécules organiques. Deux options se présentent alors :ensemencer le puits avec des microorganismes choisis ou y injecter des nutriments afin de favoriser la croissance d'espèces indigènes. Dans le premier cas, il faudra disposer d'une souche productrice de surfactants capable de résister aux conditions de température, salinité et pression régnant en profondeur. C'est par exemple le cas de *Bacillus licheniformis*, qui sécrète la lichenysine en conditions aérobies ou anaérobies et supporte sans problème

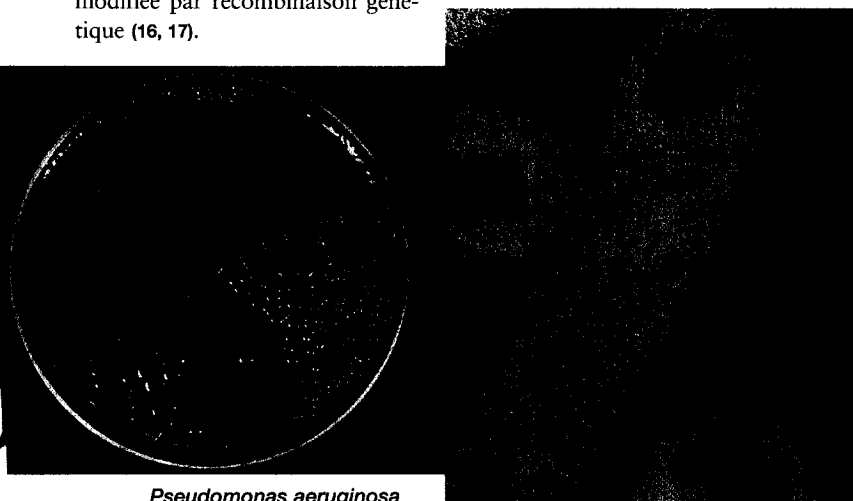
une température et une salinité élevées. La bactérie implantée devra aussi soutenir la compétition avec les espèces indigènes pour l'accès à la matrice rocheuse ou aux nutriments. Lorsqu'on vide un réservoir de stockage, il reste au fond une boue de pétrole lourd qu'il faut éliminer. En 1991, notre équipe a testé à l'échelle pilote la capacité des biosurfactants à nettoyer un réservoir et récupérer les hydrocarbures dans la boue émulsifiée (6). Nous avons utilisé deux tonnes de culture de *Pseudomonas* contenant des rhamnolipides, pour traiter 850 m³ de boue, et avons pu récupérer environ 91 % (774 m³) de cette dernière sous forme de pétrole brut valorisable. Le reste, soit 76 m³ de matériaux divers ne contenant pas d'hydrocarbures, a dû être évacué manuellement. La valeur de revente du pétrole (de 100 000 à 150 000 dollars par réservoir) couvre les frais de l'opération de nettoyage. Le procédé est donc rentable économiquement, et moins dangereux pour les personnels que la méthode classique, qui utilise des surfactants de synthèse. De plus, il évite de rejeter des boues pétrolières dans l'environnement. Cependant, à notre connaissance, il n'a pas encore été appliqué commercialement. Par ailleurs, plusieurs équipes se sont intéressées à d'autres polluants généralement difficiles à éliminer des sols : les hydrocarbures polycycliques (naphtaline, phénanthrène...), et les métaux lourds (7-9). Là encore, dans les conditions de laboratoire, les biosurfactants, en particulier les rhamnolipides, favorisent la récupération de ces polluants en facilitant leur détachement de la matrice solide. Malgré ces promesses, il reste encore beaucoup à comprendre, en particulier en ce qui concerne les mécanismes physiques d'interaction entre biosurfactants et métaux. Dans un tout autre domaine, plusieurs biosurfactants ont démontré des propriétés antimicrobiennes (10, 11). Des spécialistes de l'Institut de pharmacie de Tokyo (Japon) estiment même que la surfactine pourrait intervenir dans la lutte contre le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (12), tandis que Dirk Vollenbroich, de l'Institut Robert-Koch (Berlin, Allemagne) pense que les biosurfactants pourraient améliorer la sûreté virale des produits biotechnologiques et pharmaceutiques. Selon lui, l'activité antivirale de la surfactine serait due à une interaction avec la membrane lipidique du virus. Pour sa part, Naïm Kosaric envisage plusieurs utilisations médicales des biosurfactants : émulsifiants pour le transport des molécules actives vers leur cible, adjuvants pour vaccins ou surfactants pulmonaires (13). Si les propriétés antimicrobiennes de ces produits n'ont encore donné lieu à aucune exploitation commerciale, ils ont d'ores et déjà trouvé une niche dans le marché des cosmétiques, grâce à leurs propriétés hydratantes et leur compatibilité avec la peau (14). ■

2 - Quelques applications des biosurfactants

Propriété	Domaine d'application possible
1. Émulsifiant et dispersant	Cosmétiques, peintures, bioremédiation, nettoyage des réservoirs de pétrole
2. Solubilisants	Articles de toilette, produits pharmaceutiques
3. Agents mouillants et pénétrants	Produits pharmaceutiques, industrie textile, peintures
4. Détergents	Produits ménagers, produits agricoles, produits haute technologie
5. Agents moussants	Articles de toilette, cosmétiques, flottation de minéral
6. Agents épaississants	Peinture
7. Agents d'isolation du métal	Exploitation minière
8. Agents formant des vésicules	Cosmétiques, systèmes de délivrance de médicament
9. Facteurs de croissance microbienne	Traitement des boues d'épuration (élimination des déchets pétroliers)
10. Déesémulsifiants	Traitement des déchets, récupération/séparation du pétrole
11. Agents réducteurs de viscosité	Transport par pipeline
12. Dispersants	Mélange charbon-pétrole, mélange charbon-eau
13. Fongicide	Contrôle biologique des pathogènes des plantes

des biosurfactants pour en améliorer l'efficacité. C'est le cas pour la surfactine, dont la partie peptidique a été modifiée par recombinaison génétique (16, 17).

d'ailleurs en grande partie le choix d'une souche productrice pour telle ou telle application. Étant donné leur



Pseudomonas aeruginosa et *Bacillus subtilis*, les microorganismes producteurs de biosurfactants les plus étudiés.

On sait cependant d'ores et déjà produire, au moyen de méthodes plus classiques de récolte et culture microbiennes, une grande variété de biosurfactants naturels dont la nature chimique et les propriétés dépendent des paramètres physiques (pH, température, salinité, agitation...) de l'environnement et de la composition (ions C, N, P, Mg, Fe et Mn) du milieu nutritif. Les conditions régnant dans le futur milieu d'utilisation du biosurfactant déterminent

diversité chimique et fonctionnelle, les biosurfactants trouveront probablement des applications aussi variées que leurs homologues de synthèse (voir le tableau 2).

Reste qu'ils ne peuvent actuellement les concurrencer à cause de leur coût de production. Il faudra également mener à bien des tests de toxicité, ce qui n'est toujours pas fait. De plus, si ces composés se montrent prometteurs en laboratoire, leur utilisation *in situ* exigera une meilleure connaissance des conditions physico-chimiques qu'ils devront affronter. Il n'empêche que des applications commerciales devraient émerger dans un proche avenir. ●

Après un diplôme de
1er cycle universitaire en Biologie
(DEUG, DUT, BTS)

Devenez Cadre Technicien
dans l'Agro-industrie
(I.A.A. - Agro-chimie - Agro-aliments)



Une formation
de l'Université
Bordeaux 1
à Agen (47)

Maîtrise de Sciences et Techniques
(Bac + 4)

**MST : Agro-développement
Transformations agro-industrielles**

1 200 heures d'enseignement
en :

Sciences économiques
Stratégie d'entreprise
Production
Agro-molécules
Sciences des aliments
Génie des procédés
Biotechnologies

par des professionnels - des universitaires

Des missions en entreprise

(sous forme de stages)

- 8 semaines en 1re année
- 6 mois en 2e année
- Des conférences, des visites d'entreprises, du multimédia

Candidatures :

01/04 au 15/06/2000 : pré-inscriptions

07/ 2000 : sélection des candidats

Contacts : 05 53 77 21 67 ou par e-mail :

c.atgie@mst-agen.u-bordeaux.fr

Internet : www.dus-agen.u-bordeaux.fr

01/09/2000 Ouverture d'un **DESS :**
**"Production et Transformations
Agro- Industrielles"**