الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالمي والبحث العلمي

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة محمد الصديق بن يحي- جيجل -

Université Mohammed Seddik Benyahia- Jijel -

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie Appliquée

et Sciences Alimentaires



كايــة عــلوم الطـبيعة و الحــياة قــسم الميكـروبيـولوجيا التطـبيـقيـة و العــلوم الغـذائيـة

Thèse de Doctorat en Sciences

Spécialité: Sciences Alimentaires

Thème

Les anchois traditionnels : Qualité, isolement des bactéries halophiles et caractérisation de leurs hydrolases

Présentée par

AYAD Rima

Devant le jury composé de :

Président :	Pr. LEGHOUCHI Essaid	Univ. Mohammed Seddik Benyahia, Jijel
Rapporteur :	Pr. IDOUI Tayeb	Univ. Mohammed Seddik Benyahia, Jijel
Co-rapporteur :	Pr. OULED HADDAR Houria	Univ. Mohammed Seddik Benyahia, Jijel
Examinateurs :	Pr. OUCHEMOUKH Salim	Univ. Abderrahmane Mira, Béjaïa
	Dr. BOUBENDIR Abdelhafid	C. Univ. Abdelhafid Boussouf, Mila
	Dr. BOUREKOUA Hayat	INATAA, Univ. Frères Mentouri, Constantine 1

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Avant tout je remercie ALLAH, le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.

Je suis particulièrement reconnaissante à Pr LEGHOUCHI Essaid, Université Mohammed Seddik Benyahia-Jijel pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de soutenance. J'adresse également mes sincères remerciements aux membres du jury: Pr OUCHEMOUKH Salim, Université Abderrahmane Mira-Béjaïa; Dr BOUBENDIR Abdelhafid, Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila et Dr BOUREKOUA Hayat INATAA, Université Frères Mentouri-Constantine 1; pour l'honneur qu'ils m'ont fait pour leur participation à mon jury de thèse en qualité d'examinateurs et pour leur temps consacré à la lecture de ce travail.

Je tiens à remercier plus particulièrement Pr IDOUI Tayeb, Université Mohammed Seddik Benyahia, Jijel et Pr OULED HADDAR Houria, Université Mohammed Seddik Benyahia, Jijel pour la confiance qu'ils m'ont témoigné en acceptant la charge de direction de thèse et de m'avoir permis de mener à bien ce travail grâce à leur soutien de chaque instant, leur générosité et leurs conseils toujours très pertinents.

Mes sincères remerciements vont également à Pr BOUHALI Omar, Vice-recteur chargé des relations extérieures, de la coopération, de l'animation et de la communication et des manifestations scientifiques et Pr BENZAID Riad Vice-recteur de la formation supérieure du premier et deuxième cycles, la formation continue et les diplômes, et la formation supérieure de graduation.

J'adresse ici ma profonde amitié à Mme BELHOULA Nora pour son immense aide, sa gentillesse et sa générosité. Un grand merci Nora, tous les mots de remerciements ne suffisent jamais pour te montrer à quel point je te suis très reconnaissante.

Je tiens à remercier chaleureusement Pr. Juan PARRADO-RUBIO, Université de Séville, Espagne, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et me donné la chance de bénéficier de ses compétences et qualités scientifiques. Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude à Pablo CABALLERO-JIMÉNEZ, Sandra MACÍAS-BENÍTEZ et Bruno RODRÍGUEZ-MORGADO, pour leurs conseils et remarques intéressants et surtout pour leurs qualités humaines. Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements à Pr. Josefina MARTÍNEZ MARTÍNEZ, Université de Barcelone, Espagne, pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser une partie de ce travail dans son laboratoire. Je tiens également à remercier Dr. Susana V. VALENZUELA, Carolina BURUAGA RAMIRO et Verónica L. CABANÃS pour leur contribution à ce travail.

Mes remerciements seront incomplets si je n'adresse pas mes profonds sentiments de gratitude et de reconnaissance à mes parents, mon oncle Seddik, mes sœurs et mes frères pour leur soutien ininterrompu et leurs encouragements durant toute cette période de travail.

Avant-propos

Le présent travail a fait l'objet de publication et des communications nationales suivantes:

Ayad, R., Idoui, T., Ouled Haddar, H., Valenzuela, S. (2021). Depth effect on quality characteristics of traditional salted-ripened anchovy (*Engraulis encrasicolus*) taken from different parts of the same barrel. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 13(4), 62-76. DOI: 10.34302/crpjfst/2021.13.4.6.

Ayad, R., Idoui, T. Criblage d'hydrolases extracellulaires chez des bactéries halotolérantes isolées d'anchois salés. 3^{èmes} Journées des Sciences de la Nature et de la Vie, Béjaia, Algérie, 11 et 12 Novembre 2014. Poster.

Ayad, R., Idoui, T., Ouled Haddar, H. Screening d'amylases extracellulaires chez des microorganismes halophiles isolés d'anchois salés. 20^{èmes} Journées Nationales de Microbiologie, Jijel, Algérie, 12 et 13 Novembre 2014. Poster.

Table des matières

Avant-propos Liste des abréviations Liste des figures Liste des tableaux	i ii iii
Introduction	1
I Revue hibliographique	4
Chapitre I. Technologie de salage de l'anchois Européen	4
I.1. Notion de petits pélagiques	1
I.2. Anchois Européen Engraulis encrasicolus	- -
I.3. Composition nutritionnelle de l'anchois Européen	5
I.4. Technologie de salage	6
I.4.1. Qualité de la matière première	7
I.4.2. Qualité du sel	, 7
I.4.3. Méthodes de salage	, 7
I.4.3.1. Salage à sec.	, 7
I.4.3.2. Salage humide (ou salage en saumure)	8
I.4.3.3. Salage mixte	8
I.4.4. Procédé de production des anchois salés	9
I.4.4.1. Dynamique et physicochimie du salage	10
I.4.4.2. Microbiologie du salage	11
I.4.4.3. Aspect sensoriel du salage	12
I.4.4.4. Rôle des enzymes dans le processus de maturation	14
Chapitre II. Potentiel biotechnologique des bactéries halophiles	14
II.1. Habitats salins et hypersalins	14
II.2. Classification des halophiles	15
II.3. Diversités phylogénétique et métabolique	16
II.3.1. Archaea halophiles	17
II.3.2. Bactéries halophiles	17
II.3.3. Eucaryotes halophiles	18
II.4. Stratégies d'adaptation	18
II.4.1. Stratégie Salt-in	18
II.4.2. Stratégie Salt-out	19
II.5. Potentiel biotechnologique des bactéries halophiles et haloalcaliphiles	19
II.5.1. Enzymes halophiles et haloalcaliphiles	20
II.5.1.1. Adaptation au sel	20
II.5.1.2. Propriétés générales	20
II.5.1.3. Composition en acides aminés	21
Chapitre III. α-amylases des bactéries halophiles	23
III.1. Amidon	23 24
III.2. Classification des amylases	24
III.2.1. α-amylase	24

III.2.2. β-amylase	24
III.2.3. Glucoamylase	24
III.4. Production des amylases par les halophiles	28
III.4.1. Méthodes de production	28
III.4.2. Facteurs influençant la production de l'α-amylase	29
III.4.2.1. Effet du pH, de la température et de l'agitation	29
III.4.2.2. Effet de la taille de l'inoculum	30
III.4.2.3. Effet des sources de carbone	30
III.4.2.4. Effet des sources alternatives de carbone	30
III.4.2.5. Effet des sources d'azote	31
III.4.2.6. Effet du sel et des ions métalliques	31
III.5. Dosage des α-amylases	32
III.6. Purification des α-amylases	33
III.7. Caractérisation et propriétés spécifiques	34
III.7.1. Effet du pH et de la température	34
III.7.2. Effet du sel et des ions métalliques	34
III.7.3. Spécificité au substrat	34
III.7.4. Stabilité en présence de solvants organiques	35
III.7.5. Stabilité en présence d'agents tensioactifs	35
III.8. Applications des α -amylases halophiles	35
III.8.1. Liquéfaction et saccharification de l'amidon	36
III.8.2. Formulations des détergents	36
III.8.3. Clarification des jus de fruits	37
II. Partie expérimentale	38
II.1. Préparation de l'anchois salé-mûr	38
II.2. Echantillonnage	38
II.3. Détermination des paramètres physiques des anchois frais	38
II.4. Évaluation sensorielle des anchois salés-mûrs	38
II.5. Composition proximale et analyse physicochimique des anchois salés-mûrs	39
II.5.1. Détermination du pH	40
II.5.2. Détermination de l'acidité titrable totale (ATT)	40
II.5.3. Détermination de la teneur en sel	40
II.5.4. Détermination de la teneur en eau	41
II.5.5. Détermination de la teneur en matière sèche (MS)	41
II.5.6. Détermination de la teneur en cendres	42
II.5.7. Détermination de la teneur en matière grasse (MG)	42
II.5.8. Détermination de la teneur en protéines brutes (N)	43
II.5.9. Détermination de l'indice de peroxyde (Ip)	43
II.5.10. Détermination de l'indice de saponification (Is)	44
II.5.11. Détermination de l'indice d'acide (Ia)	44
II.5.12. Détermination de la composition en acides gras	45
II.5.13. Détermination de la teneur en matière minérale et éléments traces métalliques	45
II.6. Analyse microbiologique	45
II.6.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales	45

II.6.2. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)	46
II.6.3. Dénombrement des coliformes totaux et des coliformes thermo-tolérants	46
II.6.4. Dénombrement des bactéries lactiques	46
II.6.5. Recherche et dénombrement des <i>Clostridium-sulfito-réducteurs</i>	47
II.6.6. Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	47
II.6.7. Dénombrement des levures et moisissures	47
II.6.8. Dénombrement de la flore halophile	47
II.7. Caractérisation des isolats halophiles	48
II.7.1. Screening des activités hydrolytiques extracellulaires	48
II.7.1.1. Mise en évidence de l'activité amylolytique	48
II.7.1.2. Mise en évidence de l'activité cellulolytique (CMCase)	48
II.7.1.3. Mise en évidence de l'activité pectinolytique	48
II.7.1.4. Mise en évidence de l'activité xylanolytique	48
II.7.1.5. Mise en évidence de l'activité protéolytique	49
II.7.1.6. Mise en évidence de l'activité lipolytique	49
II.7.2. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies	49
II.7.2.1. Caractérisation macroscopique	49
II.7.2.2. Caractérisation microscopique	50
II.7.3. Caractérisation physiologique des isolats	50
II.7.4. Caractérisation biochimique des isolats halophiles	51
II.7.4.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires	51
II.7.4.2. Recherche de la β-galactosidase	51
II.7.4.3. Recherche de la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et	
l'arginine dihvdrolase (ADH)	52
II.7.4.4. Recherche de l'uréase	52
II.7.4.5. Recherche du nitrate réductase	52
II.7.4.6. Production d'indole	52
II.7.4.7. Croissance sur le milieu <i>Triple Sugar Iron</i> (TSI)	53
II.7.4.8. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité	53
II.7.4.9. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons	53
II.7.4.10. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM)	53
II 7 4 11 Tests sur Galerie API $^{(0)}$ OE TM	53
II 7 5 Caractérisation moléculaire des isolats performants	54
II 7 5 1 Extraction de l'ADN génomique	54
II 7 5 2 Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN	55
II 7 5 3 Réaction de nolymérisation en chaine (PCR)	55
II 7 5 4 Electrophorèse sur gel d'agarose	55
II 7 5 5 Séquencage des produits d'amplification	56
II 8 Sélection de la souche la plus performante	56
II 9 Production d'amplase par <i>Bacillus flerus</i> AC12	56
II 9.1 Mesure de l'activité anylasique	56
II 9.2 Estimation du taux des protéines	57
II 9 3 Cinétiques de croissance et de production d'amplase	58
II 9.4 Optimisation des conditions de culture pour la production d'amplase extracellulaire	50 59
n.y.t. Optimisation des conditions de culture pour la production d'antylase extracellulaire	50

II.9.4.1. Effet de la température et la période d'incubation sur la production d'amylase	59
II.9.4.2. Effet du pH	59
II.9.4.3. Effet de la concentration en sel	59
II.9.4.4. Effet de la vitesse d'agitation	59
II.9.4.5. Effet de la concentration (volume) de l'inoculum	59
II.9.4.6. Effet des sources de carbone	60
II.9.4.7. Effet des sources d'azote	60
II.9.4.8. Effet des acides aminés et des ions métalliques	61
II.10. Purification partielle de l'enzyme brute extracellulaire	61
II.10.1. Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE et zymographie de l'enzyme.	61
II.10.1.1. Électrophorèse SDS-PAGE	61
II.10.1.2. Zymographie de l'enzyme	62
II.10.2. Caractérisation de l'enzyme partiellement purifiée	63
II.10.2.1. Effet de la température sur l'activité et la stabilité	63
II.10.2.2. Effet du pH sur l'activité et la stabilité	63
II.10.2.3. Effet de la concentration en sel sur l'activité et la stabilité	63
II.10.2.4. Effet du temps de la réaction	63
II.10.2.5. Effet des ions métalliques sur l'activité et la stabilité	64
II.10.2.6. Effet des détergents et des surfactants sur l'activité de l'amylase	64
II.10.2.7. Effet des solvants organiques	64
II.10.2.8. Détermination de la spécificité au substrat	64
II.10.2.9. Détermination de la stabilité au stockage	65
II.11. Production de l'amylase par deux types de fermentation en présence des substrats	
d'amidon brut	65
II.11.1. Fermentation submergée (SmF)	65
II.11.2. Fermentation en milieu solide (SSF)	65
II.12. Applications industrielles possibles de l'amylase produite par Bacillus flexus AC12.	66
II.12.1. Clarification du jus de pomme	66
II.12.2. Compatibilité de l'amylase avec les détergents de commerce	66
II.13. Analyse statistique	67
III. Résultats et Discussion	68
III. 1. Détermination des paramètres physiques des anchois frais	68
III. 2. Evaluation sensorielle	68
III. 3. Composition proximale et analyse physicochimique des anchois	69
III. 3.1. Détermination du pH et de l'acidité titrable totale (ATT)	69
III.3.2. Détermination des teneurs en sel, en eau et en matière sèche	70
III. 3.3. Détermination de la teneur en cendres	71
III. 3.4. Détermination de la teneur en matière grasse	71
III. 3.5. Détermination de la teneur en protéines brutes	71
III. 3.6. Détermination des indices de peroxyde, de saponification et d'acide	72
III. 3.7. Détermination de la composition en acides gras	72
III. 3.8. Détermination de la teneur en matière minérale et éléments traces métalliques	74
III.4. Analyse microbiologique	76
III. 5. Caractérisation des isolats halophiles	78

III. 5.1. Screening des activités hydrolytiques extracellulaires	78
III. 5.2. Caractérisation morphologique des isolats	80
III. 5.3. Caractérisation physiologique des isolats	81
III. 5.4. Caractérisation biochimique des isolats halophiles	81
III. 5.5. Caractérisation moléculaire des isolats performants	86
III.6. Sélection de la souche la plus performante	87
III.7. Production d'amylase par <i>Bacillus flexus</i> AC12	87
III.7.1. Cinétiques de croissance et de production de l'amylase par <i>Bacillus flexus</i> AC12	88
III.7.2. Optimisation des conditions de culture pour la production de l'amylase	89
extracellulaire	
III.7.2.1. Effet de la durée d'incubation	89
III.7.2.2. Effet de la température	90
III.7.2.3. Effet du pH	91
III.7.2.6. Effet de la concentration en sel	92
III.7.2.4. Effet du volume de l'inoculum	94
III.7.2.5. Effet de la vitesse d'agitation	95
III.7.2.7. Effet des ions métalliques	96
III.7.2.8. Effet des sources de carbone	97
III.7.2.9. Effet des sources d'azote	101
III.8. Cinétiques de croissance et de production d'amylase par <i>Bacillus flexus</i> AC12 après	
optimisation	103
III.9. Purification partielle de l'enzyme brute extracellulaire	104
III.10. Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE et zymographie de l'enzyme	105
III.11. Caractérisation de l'enzyme partiellement purifiée	106
III.11.1. Effet de la température sur l'activité et la stabilité	106
III.11.2. Effet du pH sur l'activité et la stabilité	107
III.11.3. Effet de la concentration en sel sur l'activité et la stabilité	108
III.11.4. Effet du temps de réaction	110
III.11.5. Effet des ions métalliques sur l'activité et la stabilité	110
III.11.6. Effet des détergents et des surfactants sur l'activité et la stabilité	111
III.11.7. Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité	112
III.11.8. Détermination de la spécificité au substrat	113
III.11.9. Détermination de la stabilité au stockage	114
III.12. Production de l'amylase par deux types de fermentation en présence des substrats	115
d'amidon brut	115
III.13. Applications industrielles possibles de l'amylase produite par Bacillus flexus	
AC12	116
III.13.1. Clarification du jus de pomme	116
III.13.2. Compatibilité de l'amylase avec les détergents de commerce	117
Conclusion	119
Références bibliographiques	122
Annexes	I-XIV
Résumés	

Liste des abréviations

AC : Anchois.

ADN: Acide désoxyribonucléotidique.

AOAC: Association of Official Analytical Chemists.

AOCS: American Oil Chemists' Society.

API: Appareillage et Procédé d'Identification.

ARN: Acide ribonucléotidique.

ARNr 16S: Acide ribonucléique codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomal.

a_w: water activity.

Blast: Basic Local Alignment Search Tool.

CE: Commission Européenne.

CMC: CarboxyMéthylCellulose.

DMSO: DiMéthylSulfOxyde.

DNS: 3,5-Dinitrosalicylic acid.

DO: Densité Optique.

EC: Enzyme Commission.

EDTA: Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

kDa: kiloDalton.

MOS: Malto-oligosaccharides.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

NF: Norme Française.

OVAT: One Variable At a Time.

pb: paire de bases.

PEG: PolyEthylene Glycol

pH: potentiel Hydrogène.

PMSF: PhenylMethylSulfonyl Fluoride ou Fluorure de PhénylMéthylSulfonyle.

rpm: revolution per minute.

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis.

SmF: Submerged Fermentation.

SSF: Solide State Fermentation.

UI: Unité Internationale.

USD: United States Dollar.

Liste des figures

Figure 1. Caractéristiques morphologiques de l'anchois Européen Engraulis encrasicolus:	
^{a)} position de la bouche et forme du museau; ^{b)} forme du corps (Whitehead, 1985)	5
Figure 2. Phylogénie à base moléculaire des trois domaines, mettant en évidence (rectangles	
rouges) les groupes microbiens halophiles. (A)Arbre bactérien modifié d'après Castelle et Banfield	
(2018). ^(B) Phylogénie archéenne modifiée à partir de Baker et al. (2020) ; les points rouges indiquent les groupes	
pour lesquels il n'existe pas de représentants cultivés. ^(C) Arbre eucaryote modifié d'après Burki et al. (2020)	16
Figure 3. Les régions hydrophobes sont mises en évidence en orange, les régions hydrophiles en	
bleu. Les substitutions conservées sur la surface accessible aux solvants sont indiquées par des	
flèches. L'encart montre la localisation de la surface accessible par solvant dans l'hexamère. (A)	
Surface accessible au solvant de GsNiRet (B) TvNiR avec les potentiels électrostatiques relatifs de surface. La	
surface de TvNiR est chargée négativement (Popinako et al., 2017)	22
Figure 4. Courbe d'étalonnage de glucose par la méthode de DNS (Annexe II)	
Figure 5. Courbe d'étalonnage de BSA par la méthode de Bradford (Annexe II)	
Figure 6. Exemples de mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires	79
Figure 7. Effectif des activités hydrolytiques extracellulaires (Annexe III)	
Figure 8. Morphologie cellulaire et caractéristiques de la paroi cellulaire de deux isolats	
halophiles après coloration de Gram (grossissement \times 100). ^{A)} AC12; ^{B)} AC3	81
Figure 9. Produits d'amplification PCR du gène d'ARNr 16S des isolats d'intérêt sur gel	
d'agarose 0.8 % (p/v). ^{M)} Marqueur moléculaire <i>Gene Ruler</i> 1 kb	87
Figure 10. Cinétiques de croissance bactérienne et de production d'amylase avant optimisation	
dans un milieu LB additionné de 1% d'amidon à 37°C sous agitation 150 rpm	88
Figure 11. Effet de la durée d'incubation sur la production d'amylase par Bacillus flexus AC12	
dans un milieu LB additionné de 1% d'amidon à 37°C sous agitation 150 rpm	89
Figure 12. Effet de la température sur la production d'amylase par Bacillus flexus AC12 dans un	
milieu LB additionné de 1% d'amidon pendant 72 h sous agitation 150 rpm	91
Figure 13. Effet du pH sur la production d'amylase par Bacillus flexus AC12 dans un milieu LB	
additionné de 1% d'amidon à 37°C durant 72 h sous agitation 150 rpm	92
Figure 14. Effet de la concentration saline sur la production d'amylase par <i>Bacillus flexus</i> AC12	
dans un milieu LB aux différentes concentrations de NaCl, additionné de 1% d'amidon à 37°C	
durant 72 h sous agitation 150 rpm	94

Figure 15. Effet du volume de l'inoculum sur la production d'amylase par <i>Bacillus flexus</i> AC12	
dans un milieu LB à 5% de NaCl, additionné de 1% d'amidon à 37°C durant 72 h sous agitation	
150 rpm	95
Figure 16. Effet de la vitesse d'agitation sur la production d'amylase par Bacillus flexus AC12	
dans un milieu LB à 5% de NaCl, additionné de 1% d'amidon à 37°C durant 72 h	96
Figure 17. Effet des ions métalliques sur la production d'amylase par Bacillus flexus AC12 dans	
un milieu de production (6)à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm	97
Figure 18. Effet des sources de carbone sur la production d'amylase par Bacillus flexus AC12	
dans un milieu de production (2) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm	98
Figure 19. Effet de la concentration de substrat sur la production d'amylase par Bacillus flexus	
AC12 dans un milieu de production (2) à différentes concentrations d'amidon à 37°C durant 72 h	
sous agitation 100 rpm	99
Figure 20. Effet des sources alternatives de carbone sur la production d'amylase par Bacillus	
flexus AC12 dans un milieu de production (3) à base de déchets de cuisine (2%) à 37°C durant 72	
h sous agitation 100 rpm	100
Figure 21. Effet des sources d'azote organique sur la production d'amylase par Bacillus flexus	
AC12 dans un milieu de production (4) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm	101
Figure 22. Effet des sources d'azote inorganique sur la production d'amylase par Bacillus flexus	
AC12 dans un milieu de production (4) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm	102
Figure 23. Effet des acides aminés sur la production d'amylase par Bacillus flexus AC12 dans un	
milieu de production (5) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm	103
Figure 24. Cinétiques de croissance bactérienne et de production d'amylase après optimisation	
dans un milieu de production (7) à 37°C sous agitation 100 rpm	104
Figure 25. Résultats de la SDS-PAGE et du zymogramme de l'amylase produite par <i>B. flexus</i>	
AC12. ^{M)} Marqueurs protéiques ; ¹⁾ Enzyme partiellement purifiée ; ²⁾ Hydrolyse du substrat dans le gel	106
Figure 26. Effet du temps de réaction sur l'activité amylasique	110
Figure 27. Spécificité de l'amylase aux différents substrats	114
Figure 28. Stabilité de l'amylase au stockage	115
Figure 29. Production fermentaire d'amylase sous fermentations SmF et SSF	116
Figure 30. Effet de l'enzyme sur la clarification et le taux des sucres réducteurs du jus de	
pomme	117
Figure 31. Compatibilité de l'amylase avec les détergents de commerce	118

Liste des tableaux

Tableau 1. Composition nutritionnelle de l'anchois Européen E. encrasicolus (g/100g) (Aakre
et <i>al.</i> , 2020)
Tableau 2. Classification des halophiles basée sur la tolérance au sel (Kushner et Kamekura,
1988) 15
Tableau 3. Enzymes amylasiques (α -amylase, β -amylase et glucoamylase) provenant de
microorganismes halophiles (Amoozegar et <i>al.</i> , 2019)
Tableau 4. Évaluation organoleptique de l'anchois salé-mûr (Filsingeret <i>al.</i> , 1982)39
Tableau 5. Composition du tampon acide acétique (20 mM) / acétate de potassium (20 mM)
(Annexe I)
Tableau 6. Composition du tampon phosphate (20mM) (Annexe I)
Tableau 7. Composition du tampon glycine (20mM)/ NaOH (20mM)*(Annexe I)
Tableau 8. Milieux de culture utilisés pour la caractérisation physiologique et biochimique
(Harley et Prescott, 2002) (Annexe I)
Tableau 9. Lecture de la galerie miniaturisée API 20E (Annexe III)
Tableau 10. Composition des milieux de culture utilisés pour l'optimisation de la production
d'amylase
Tableau 11. Paramètres étudiés lors de l'optimisation du milieu de production de l'amylase59
Tableau 12 . Composition des gels utilisés pour l'électrophorèse SDS-PAGE
Tableau 13. Caractéristiques physiques, sensorielles et physicochimiques des différents
échantillons d'anchois salés-mûrs
Tableau 14. Composition en acides gras des échantillons d'anchois salés-mûrs
Tableau 15. Teneurs en éléments minéraux et traces métalliques des échantillons d'anchois
salés-mûrs
Tableau 16. Caractéristiques microbiologiques des échantillons d'anchois salés-mûrs78
Tableau 17. Screening des activités hydrolytiques extracellulaires (Annexe III)
Tableau 18. Caractéristiques morphologique et biochimique des isolats bactériens sélectionnés83
Tableau 19. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN (Annexe III)
Tableau 20. Espèces présentant les meilleures correspondances de similitude (100%) dans le
Blast de l'ADNr 16S (Annexe III)
Tableau 21. Caractéristiques biochimiques de la souche AC1 et de ses espèces les plus proches
(Annexe III)

Tableau 22. Caractéristiques biochimiques de la souche AC3 et de ses espèces les plus proche	S
(Annexe III)	

 Tableau 23.Caractéristiques biochimiques de la souche AC22 et de ses espèces les plus proches

 (Annexe III)

Tableau 24. Indice enzymatique des isolats d'intérêt sur gélose à base d'amidon (Annexe III)					
Tableau 25. Résultats des étapes de la purification partielle de l'enzyme					
Tableau 26.Effet des conditions du mélange réactionnel, température, pH et concentration					
saline, sur l'activité et la stabilité de l'amylase	109				
Tableau 27. Valeurs moyennes de l'activité amylasique relative et résiduelle en présence de					
différents agents chimiques	112				
Tableau 28. Valeurs moyennes de l'activité amylasique relative et résiduelle en présence de					
différents solvants organiques	113				

Introduction

Le processus de salage-maturation du poisson est une pratique traditionnelle répandue dans les pays européens pour prolonger la durée de conservation de différentes espèces de poissons, comme le hareng de l'Atlantique (Clupea harengus), le sprat (Sprattus sprattus), la sardine (Sardina pilchardus) et l'anchois Européen (Engraulis encrasicolus). Parmi ces variétés de produits, l'anchois salé-mûr occupe une importance majeure dans le marché mondial avec un total de 16.408 tonnes équivalent poids vif (Czerner et Yeannes, 2013 ; EUMOFA, 2018). Ce processus est le plus souvent réalisé en tenant compte des paramètres de sécurité et de qualité du produit. Comme d'autres aliments fermentés naturellement, le processus implique différents microorganismes avec des mécanismes métaboliques dissemblables afin de modifier la saveur et d'autres caractéristiques sensorielles qui nécessitent la participation d'un éventail diversifié d'activités enzymatiques (Besteiro et al., 2000 ; Zgomba Maksimovic et al., 2018). L'anchois salé-mûr est préservé en raison d'une teneur élevée en NaCl et d'une faible activité de l'eau. Ces conditions empêchent la croissance des bactéries pathogènes et d'altération typiques (Yeannes, 1996 ; Czerner et Yeannes, 2014) et conduisent à la croissance d'une grande diversité de microbiotes halophile ou halotolérant capables de survivre et de se développer dans des environnements salins et hypersalins (Perez et al., 2018 ; Fuka et al., 2020). Récemment, un intérêt particulier est porté à l'étude de la microflore halophile des écosystèmes alimentaires salés en particulier ceux à base de poissons (Gassem, 2019; Perez et al., 2020, 2021). Ces microorganismes exceptionnels sont dotés d'activités métaboliques et physiologiques adaptées pour fonctionner à fortes salinités. Leurs enzymes ont des propriétés uniques qui leur permettent de présenter une activité et une stabilité élevées en présence de sel, ce qui ouvre de nouvelles possibilités et opportunités de prospection biotechnologique (Karan et al., 2012; Nercessian et al., 2015; Fongaro et al., 2020).

L'industrie des enzymes est l'une des industries les plus importantes au monde. Sur le marché mondial, il existe toujours un besoin de découvrir des enzymes dotées d'activités nouvelles, exceptionnelles et d'une stabilité élevée (**Thapa et al., 2019**). Ce besoin est alimenté par les exigences industrielles et la nécessité d'interventions enzymatiques dans des bioprocédés nouveaux et difficiles. Les applications industrielles des enzymes nécessitent qu'elles soient stables dans des conditions opérationnelles difficiles. Récemment, les bactéries halophiles ont suscité un intérêt en raison de leur capacité à s'adapter à des concentrations de sel très élevées (**Torregrosa-Crespo et al., 2017**). Les hydrolases d'origine halophile ont des traits très différents de ceux des mésophiles. Ces enzymes sont tolérantes aux plusieurs conditions

extrêmes telles que le pH alcalin, la température élevée et les fortes concentrations de sel. Ces attributs à multiples facettes sont attrayants et permettent leur utilisation dans l'industrie, principalement dans l'alimentation, la production de charcuterie, de saumures, la transformation des produits de la mer et le traitement des déchets générés par ces processus. De cette façon, il est possible de satisfaire le besoin de disposer de processus propres, de rentabilité industrielle et des améliorations biotechnologiques (Flores-Gallegos et *al.*, 2019). La plupart des hydrolases halophiles telles que les amylases, les cellulases, les lipases, les xylanases et les protéases ont été signalées chez les bactéries halophiles (De Lourdes Moreno et *al.*, 2013 ; Ali et *al.*, 2014). Beaucoup d'entre elles ont été étudiées en détail et caractérisées comme de nouveaux biocatalyseurs (Kumar et *al.*, 2016).

Les amylases sont parmi les enzymes les plus importantes et ont un impact significatif sur la biotechnologie en constituant une classe d'enzymes industrielles qui représente environ 25-30% du marché mondial des enzymes (Azad et al., 2009). Le marché mondial des amylases a augmenté chaque année et est estimé à 320.1 millions USD en 2024 (Ashraf et al., 2018). Malgré leur grand potentiel pour les applications industrielles, les études sur les α -amylases halophiles sont très limitées. À ce jour, pas plus de 34 amylases halophiles ont été purifiées et caractérisées à partir d'Archaea, de bactéries et de champignons halophiles (Amoozegar et al., 2019; Deutch et Yang, 2020; Gómez-Villegas et al., 2021; Siroosi et al., 2021). Très peu de genres de bactéries halophiles ou halotolérantes, dont Micrococcus, Halomonas, Nesterenkonia, Chromohalabacter, Marinobacter, Halobacillus, Thalassobacillus et Bacillus, ont été signalés comme producteurs d'amylase (Delgado-García et al., 2012 ; Suganthi et al., 2015 ; Amoozegar et al., 2019). Une attention plus considérable a été accordée aux espèces Bacillus spp. en raison de leurs besoins en nutriments bon marché et de leur taux de croissance rapide. Les espèces de Bacillus sont connues pour produire des enzymes qui résistent à la salinité, au pH alcalin et aux températures élevées, ce qui leur confère un grand intérêt industriel. Ces bactéries sont responsables d'environ 50% du marché total des enzymes (Schallmey et al., 2004; Vaikundamoorthy et al., 2018; Obi et al., 2019).

La recherche d'amylase microbienne avec de nouvelles activités et une stabilité améliorée est un travail difficile qui peut soutenir commercialement plusieurs industries connexes (Sahoo et *al.*, 2016), dans ce contexte, l'isolement et le criblage des organismes halophiles pour des amylases de traits désirés est un domaine de recherche contemporain (Kumar et Khare, 2015). Sur cette base, la présente étude a été principalement entreprise pour caractériser et évaluer le potentiel biotechnologique d'une amylase extracellulaire produite par une bactérie haloalcalitolérante *Bacillus flexus* AC12 isolée d'un écosystème alimentaire salé : les anchois traditionnels salés-mûrs. Pour atteindre cet objectif, quatre aspects ont été étudiés :

- ✓ Le premier aspect était l'évaluation et la comparaison des attributs de qualité de trois échantillons prélevés de profondeurs différentes d'un même baril d'anchois salés (*Engraulis encrasicolus*) produits selon une méthode traditionnelle, en évaluant leur composition proximale, leurs caractéristiques physicochimiques, microbiennes et sensorielles. Le concept de l'effet de profondeur sur l'ensemble des caractéristiques de qualité de l'anchois Européen salé-mûr traditionnel est étudié pour la première fois dans ce travail.
- ✓ Le deuxième portait sur le criblage et l'identification de bactéries halotolérantes productrices d'enzymes extracellulaires d'importance industrielle, avec un intérêt particulier pour les activités polysaccharidiques.
- ✓ Le troisième était l'optimisation des conditions de culture et le développement d'un milieu approprié pour obtenir un maximum de production de l'enzyme d'intérêt; par la suite l'amylase a été partiellement purifiée et caractérisée.
- ✓ Enfin, le dernier aspect de cette recherche était l'application de cette enzyme et l'utilisation potentielle des déchets de cuisine et agricoles comme milieu à faible coût pour la produire sous deux méthodes de fermentations, en milieu solide et submergée.

Ce manuscrit est structuré en trois parties dont la première est une revue bibliographique traitant tout ce qui concerne la technologie de salage de l'anchois Européen (*Engraulis encrasicolus*), les microorganismes halophiles, leurs diversités métabolique et phylogénétique, leurs stratégies d'adaptation aux fortes salinités, les propriétés de leurs enzymes en détaillant plus particulièrement les amylases et leur potentiel biotechnologique. La seconde partie rapporte la méthodologie détaillée du travail et la troisième expose tous les résultats obtenus comparés et discutés.

Revue

bibliographique

I.1. Notion de petits pélagiques

Par définition, les poissons pélagiques vivent dans le domaine pélagique, c'est-à-dire qu'ils se déplacent librement dans la colonne d'eau où ils passent la plupart de leur temps (**Fréon et** *al.*, **2005**). Les petits poissons pélagiques jouent un rôle écologique extrêmement important dans les écosystèmes marins, constituent certaines des ressources halieutiques les plus précieuses sur le plan économique et jouent un rôle vital dans la sécurité alimentaire mondiale. En raison de leur court temps de génération et de leur couplage étroit avec les niveaux trophiques inférieurs, leurs populations présentent une dynamique d'expansion et de ralentissement qui est étroitement liée à la variabilité climatique (**Richardson et** *al.*, **2014; Peck et** *al.*, **2021**).

Les anchois et les sardines ont été identifiés parmi les organismes les plus importants dans les réseaux trophiques marins, comme, dans certains écosystèmes tels que les régions de remontée d'eau, où ils occupent un niveau trophique intermédiaire fondamental. Leurs captures ne sont pas seulement importantes pour la consommation humaine directe mais aussi essentielles pour la fabrication de la farine et l'huile de poisson utilisées dans les industries agroalimentaire et aquacole (FAO, 2016 ; Lindegren et *al.*, 2018). En mer Méditerranée, les espèces telles que la sardine Européenne (*Sardina pilchardus*, Walbaum, 1792), et l'anchois Européen (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758) se sont révélés être des éléments clés dans le transfert d'énergie des organismes à niveau trophique inférieur aux organismes à niveau trophique supérieur. Ces deux espèces sont les plus importantes en termes de biomasse et d'intérêt commercial le long de la côte Algérienne (Bacha et Amara, 2012; Albo-Puigserver et *al.*, 2017).

I.2. Anchois Européen (Engraulis encrasicolus)

L'anchois Européen (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus 1758) est une espèce pélagique côtière de courte durée qui est répartie dans l'Atlantique Est, de la Norvège à l'Afrique du Sud, et dans la mer Méditerranée, la mer Noire et la mer d'Azov. En raison de son abondance dans les milieux pélagiques, l'anchois Européen est l'une des espèces de petits poissons pélagiques les plus importantes sur le plan commercial dans toute la Méditerranée, atteignant 270000 tonnes débarquées par an en moyenne dans l'ensemble du bassin (**Morello et Arneri, 2009; FAO, 2018**).

L'anchois Européen appartient à la famille des *Engraulidae* de l'ordre des *Clupeiformes*. Il a un corps très mince et fusiforme avec la coloration typique des poissons pélagiques : un dos foncé pour éviter la détection par les oiseaux, et un ventre argenté, qui est confondu avec

l'apparence de la surface de l'eau lorsqu'il est observé par le dessous. Il est couvert d'écailles minces et faciles à enlever (**Pons-Sánchez-Cascado et** *al.***, 2006**).

La taille habituelle des anchois est généralement de 12 à 15 cm. La position de la bouche est ventrale et elle est grande selon la taille du corps. La mâchoire supérieure est plus longue que la mâchoire inférieure et le bord avant de la mâchoire inférieure est à peu près au même niveau que la narine. Le museau est pointu. Il y a un maxillaire court arrondi qui s'allonge presque jusqu'à la face avant du pré-opercule (**Figure 1**). Sa nageoire anale est courte et reste derrière la base de la dernière raie dorsale. Le museau translucide et proéminent des anchois leur confère une silhouette caractéristique, et leur bouche infère s'ouvre beaucoup plus longuement que celle de la sardine (**Whitehead, 1985; Léopold, 2004**).



Figure 1. Caractéristiques morphologiques de l'anchois Européen *Engraulis encrasicolus*: ^{a)} position de la bouche et forme du museau; ^{b)} forme du corps (Whitehead, 1985).

I.3. Composition nutritionnelle de l'anchois Européen

Les anchois sont généralement classés parmi les poissons gras (**Prato et Biandolino, 2012**). Ces poissons sont riches en acides gras essentiels tels que les acides gras polyinsaturés n-3 à longue chaîne (AGPI n-3), dont l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5n-3) et l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6n-3) (**Tableau 1**), ces derniers sont considérés comme bénéfiques pour la santé humaine (**Calder, 2018**). De plus, l'anchois possède un bon complément en acides aminés essentiels, en particulier la lysine, et en micronutriments en quantité non-négligeable, notamment, l'iode, le sélénium, le calcium, le potassium, et les vitamines B₃, B₆, B₉ B₁₂, A₁ et E (**Aakre et al., 2020**). La composition nutritionnelle du poisson peut varier considérablement au sein d'une même espèce et entre les espèces, selon le type de tissu, l'habitat, la région et la saison (**Tilami et Sampels, 2017**). Ce sont les teneurs en lipides et en eau qui présentent les variations les plus marquées; les teneurs en protéines et

en cendres sont pour la plupart insignifiantes (Kaya et Turan, 2010; Šimat et Bogdanović, 2012).

Tableau	1.	Composition	nutritionnelle	de	l'anchois	Européen	Е.	encrasicolus	(g/100g)
(Aakre e	t al	., 2020).							

Éléments nutritifs	E. encrasicolus	E. encrasicolus
	(Poisson entier)	(Filet avec peau)
Eau	73.6 ± 1.50	75.4 ± 1.80
Cendres	3.0 ± 0.31	1.9 ± 0.19
Protéines	18.7 ± 0.90	19.2 ± 0.70
Lipides	4.3 ± 0.40	4.2 ± 1.10
$\sum n-3$	1.8 ± 0.03	1.5 ± 0.34
$\sum n-6$	0.14 ± 0.004	0.13 ± 0.05
Acide Eicosapentaénoïque (EPA)	0.54 ± 0.01	0.41 ± 0.01
Acide Docosahexaénoïque (DHA)	1.0 ± 0.02	0.84 ± 0.21

I.4. Technologie de salage

Le salage de différentes espèces pélagiques est une pratique traditionnelle et courante dans le monde entier (Skåra et *al.*, 2015). Il est également utilisé dans le prétraitement du poisson avant l'emploi de technologies de transformation telles que le fumage, le séchage et la mise en conserve (Turan et Erkoyuncu, 2012). Les anchois salés sont préparés dans la région méditerranéenne à partir de poissons de l'espèce *Engraulis encrasicolus*. En Argentine, au Chili et au Pérou, les espèces utilisées sont *Engraulis anchoita* et *Engraulis rigens* (Perez-Villarreal et Pozo, 1992 ; Triqui et Reinneccius, 1995).

I.4.1. Qualité de la matière première

La qualité des produits finaux est considérablement influencée par la qualité et surtout la fraîcheur du produit brut (**Sampels, 2015**). À la réception, le poisson fait l'objet d'un contrôle en vue de déceler les signes éventuels d'une altération organoleptique ou chimique tels que la présence de tâche jaune sur l'opercule, de la perte de l'intégrité du péritoine, de l'affaissement de l'œil et de la perte de l'adhérence de la colonne vertébrale au muscle. La première condition de réussite est un poisson très frais. Sinon, les parties internes du poisson commencent à se détériorer avant que le sel ne les pénètre. Rappelons l'extrême fragilité de l'abdomen qui se traduit par son éclatement même sur des individus frais (**Chaouqy et El Marrakchi, 2005**).

I.4.2. Qualité du sel

Les producteurs proposent un sel de qualité, conforme aux normes en vigueur dans l'alimentation, avec des granulométries et des préparations sur mesure selon les besoins spécifiques des utilisateurs. Le chlorure de sodium est un ingrédient essentiel du processus de maturation de l'anchois, contribuant non seulement à la saveur et à la texture de ce type de produit, mais aussi à la stabilité microbiologique (**Phelps et al., 2006**). Le sel à utiliser pour le salage doit contenir des niveaux tolérables de MgCl₂, de CaCl₂, de MgSO₄ ou de CaSO₄, de Fe²⁺ et de Cu²⁺ afin d'éviter la décoloration du poisson. Il doit également être approprié au type de salage utilisé et à la matière première à traiter. La chair du poisson est fragile, elle peut être brûlée par le sel, d'où l'importance du choix de la granulométrie (gros sel pour un poisson gras, sel fin pour un poisson maigre) qui influe sur la vitesse de pénétration (**Tuara, 1997 ; Berkel et al., 2005**).

I.4.3. Méthodes de salage

Trois méthodes de salage du poisson sont décrites ici: le salage à sec, le salage humide et le salage mixte :

I.4.3.1. Salage à sec

C'est la technique la plus traditionnelle, elle consiste à déposer du sel sur le poisson et à l'empiler de telle manière que la saumure qui en résulte s'égoutte. La pénétration du sel peut prendre plusieurs heures. Le gros sel convient mieux au salage à sec. Le sel fin attire trop rapidement l'eau de l'extérieur du poisson, ce qui rend l'extérieur dur. Par conséquent, l'eau à l'intérieur du poisson ne peut pas s'échapper et le sel ne peut pas pénétrer profondément dans le poisson. Le poisson se gâte donc malgré le salage. C'est ce qu'on appelle la « brûlure saline ». Le gros sel n'a pas cet effet (**Berkel et al., 2005**).

I.4.3.2. Salage humide (ou salage en saumure)

Dans ce procédé, le poisson est mélangé à du sel et entreposé dans des récipients étanches dans sa propre saumure (liquide qui se forme par dissolution du sel dans l'eau extraite des tissus du poisson). Les saumures peuvent être classées en saumures légères, saumures moyennes et saumures lourdes en fonction de leur concentration. L'une des classes susmentionnées peut être utilisée en fonction de la qualité du poisson à saler ou de la forme de salage souhaitée. La saumure contient 9 à 11% de sel dans le cas d'un salage léger, 14 à 16% de sel dans le cas d'un salage moyen et 24% de sel dans le cas d'un salage lourd (**Turan et Erkoyuncu, 2012**). Si la saumure est saturée à moins de 12%, le poisson absorbe la saumure,

tandis que si elle est saturée à plus de 12%, le poisson perd de l'eau et des substances solubles (Berkel et *al.*, 2005).

I.4.3.3. Salage mixte

Il est possible d'obtenir un produit de meilleure qualité en employant les méthodes de salage à sec et de salage en saumure. Le produit salé peut être conservé plus longtemps. Dans cette méthode, le poisson est tout d'abord salé à sec. L'eau évacuée par le poisson forme une solution salée concentrée avec le sel disponible. L'eau évacuée par les poissons par osmose n'est pas éliminée. Dans le cas où ladite eau ne recouvre pas la surface du poisson, une certaine quantité de solution saline saturée est ajoutée 1 ou 2 jours plus tard (**Regenstein et Regenstein, 1991; Horner, 1992**). Dans ce cas, le sel sec à la surface du poisson empêche la saumure de se diluer progressivement. Comme le sel se dissout dans l'eau rejetée par le poisson, de l'eau salée supplémentaire se forme et la saumure reste saturée. De cette façon, les aspects négatifs des deux méthodes précédentes sont éliminés (**Curtis, 1993**).

I.4.4. Procédé de production des anchois salés

Afin d'obtenir un produit de qualité supérieure, les viscères sont retirés ou partiellement retirés et, si nécessaire, la tête est enlevée immédiatement après le débarquement. Le nettoyage doit être effectué très rapidement, sinon les bactéries qui ont été transmises au poisson par l'eau de mer attaquent les tissus après la mort du poisson et entraînent leur altération. Le nettoyage permet également de faciliter et d'accélérer la pénétration de l'eau salée dans la cavité ventrale et les parties internes du poisson (**Tunal**, **1984**). Au cours du pré-salage, le poisson entier frais est immergé dans une saumure saturée pendant une période minimale de 24 h jusqu'à ce que l'équilibre osmotique soit atteint dans le muscle. Durant cette étape, l'activité de l'eau (a_w) est réduite de 0.99, correspondant au poisson cru, à 0.80-0.84 (**Filsinger, 1987; Czerner et Yeannes, 2010**). Ces anchois sont ensuite placés dans des barils en alternant des couches de poisson et de sel en commençant et en terminant par une couche de sel et disposés selon le procédé traditionnel appelé « head-tail » ou « queue-tête ».

Des poids sont appliqués sur le couvercle du baril en plaçant un tapis ou des morceaux de bois sur le dessus. Il n'est pas nécessaire d'appliquer un poids le premier jour. Cependant, il est recommandé d'appliquer un poids égal à 20% du poids du poisson le deuxième jour et un poids égal à 40% du poids du poisson après 4 ou 5 jours. Les poids empêchent les poissons d'entrer en contact avec l'air (Gülyavuz et Ünlüsayın, 1999). Le sel sec doit être ajouté à la saumure et la solution doit être bien mélangée de temps en temps car l'eau déversée par le

poisson dilue la solution. Comme les poissons salés par la méthode de saumurage n'entrent pas en contact avec l'air, l'oxydation des graisses est plus faible. Le goût et l'aspect du produit sont meilleurs. Il faut également vérifier régulièrement le récipient. Si de la mousse apparaît sur le dessus de la saumure (résultat de la fermentation), il faut remplacer la vieille saumure par une saumure fraîche (**Berkel et al., 2005**).

I.4.4.1. Dynamique et physicochimie du salage

Ce procédé se déroule en deux étapes: le salage et la maturation. La première comprend la diffusion du sel dans le poisson et l'élimination de l'eau suite à une pression osmotique dissemblable entre le poisson et la solution environnante. Ce processus se termine lorsque l'équilibre est atteint (**Barat et** *al.*, **2003; Gallart-Jornet et** *al.*, **2007**). L'absorption du sel dépend de nombreux facteurs, dont la qualité et la composition chimique de la matière première, l'espèce, le type de muscle, la taille et le poids du poisson, l'épaisseur du filet, l'état physiologique, la méthode de salage, la concentration de saumure, la durée du processus de salage, le rapport poisson/sel et la température (**Jittinandana et** *al.*, **2002; Barat et** *al.*, **2006; Bellagha et** *al.*, **2007; Gallart-Jornet et** *al.*, **2007**).

La seconde est plus lente et implique une série de processus biochimiques complexes qui provoquent des changements chimiques et physicochimiques, et dure de 3 à 12 mois selon l'espèce de poisson et la technologie de fabrication utilisée (**Roldán et** *al.***, 1985; Hernández-Herrero, 1999a, b**).

Après le processus de salage-maturation de l'anchois, la teneur en humidité diminue de 75.5% dans le poisson frais à 54% dans le poisson salé et la perte de la teneur en humidité s'accompagne d'une augmentation des teneurs en sel et en cendres. L'augmentation de la teneur en sel et en cendres des anchois salés n'est significative que pendant la première semaine de maturation. L'augmentation de la teneur en sel favorise les interactions protéine-protéine et diminue les interactions protéine-eau (Hernández-Herrero et al., 1999a). Les changements chimiques qui se produisent dans les protéines musculaires de l'anchois pendant le processus de maturation sont liés à la dégradation de la structure myofibrillaire du muscle. En dépit d'une dégradation considérable des protéines, l'anchois salé mûr conserve sa structure et est facilement découpé en filets. L'hydrolyse des protéines musculaires est importante pendant les 6 premières semaines (Hernández-Herrero et al., 2000).

El-Sebaiy et Metwalli (1989) ont rapporté que la teneur en lipides totaux du poisson diminuait suite au processus de salage-maturation, tandis que Hernández-Herrero et al.

(1999a) ont observé que la teneur en graisse de l'anchois restait constante pendant le processus de maturation, bien qu'une légère variabilité soit apparue.

Selon **Hernández-Herrero et** *al.* (**1999a**), le pH du muscle des anchois a sensiblement diminué de 6.13 à 5.72 au cours de la première semaine de maturation et est resté constant jusqu'à la 8^{ème} semaine. Alors qu'**Ababouch et El Marrakchi** (**2009**) ont rapporté une chute de 6.0 au début à 5.4 après 3 à 4 mois de maturation. Le pH du milieu et le type de sels utilisés pour le salage peuvent influencer le degré de dénaturation des protéines affectant ainsi plus ou moins la fonctionnalité des protéines (**Morrissey et** *al.*, **1987**).

I.4.4.2. Microbiologie du salage

L'anchois salé se caractérise par une teneur élevée en NaCl (14-20 g/100 g) et une activité de l'eau proche de 0.75 (Filsinger, 1987; Yeannes, 1996), ce qui empêche la croissance de bactéries pathogènes telles que Clostridium botulinum, et des bactéries d'altération typiques du poisson frais (Gram et Huss, 1996). En tenant compte de l'aspect microbiologique, différentes études ont indiqué que l'écosystème de ce type de produit est dominé par des microorganismes halotolérants et halophiles modérés et extrêmes (Hernández-Herrero et al., 1999a, 2002; Karaçam et al., 2002; Felix et al., 2004, 2007, 2016; Pons-Sánchez-Cascado et al., 2005; Moschetti et al., 2006; Rajan et al., 2010; Czerner et Yeannes, 2014; Perez et al., 2016). Les études centrées sur le rôle de ces microorganismes dans le processus de maturation sont limitées. Dans ce sens, certains auteurs avaient suggéré une participation microbienne dans le processus de maturation de l'anchois salé (Villar et al., 1985; Hernández-Herrero et al., 1999a). Czerner et Yeannes (2014) ont rapporté que le processus de maturation est dominé par des bactéries halophiles modérées, dont beaucoup ont des activités protéolytiques, lipolytiques et triméthylamine oxyde réductase. Ces activités pourraient contribuer à l'augmentation des teneurs en azote non protéique, en acides gras libres et en azote basique volatil total, trois indices qui présentent une bonne corrélation avec le temps de maturation et l'évaluation sensorielle (Hernández-Herrero et al., 1999a; Pons-Sánchez-Cascado et al., 2005).

Un autre aspect qui a été souvent étudié est la production bactérienne d'histamine et d'autres amines biogènes, qui, à forte concentration, nuit à la qualité et à la sécurité du produit final (EFSA, 2011). Les études microbiologiques sur les anchois salés ont principalement été menées sur la production d'histamine (Yeannes, 1995, 2003; Karaçam et *al.*, 2002; Pons-Sánchez-Cascado et *al.*, 2005; Felix et *al.*, 2007, 2016; Aponte et *al.*, 2010). La Commission européenne a publié deux règlements de la Commission (CE n° 1441/2007; CE

n° 1019/2013) établissant la limite d'histamine pour les produits de la pêche saumurés/salés
mûrs à 400 mg/kg de poisson. Pons-Sánchez-Cascado et al. (2003) et Ben Mohamed et al.
(2016) ont signalé que la formation des amines biogènes pendant la maturation était modérée.

Parallèlement, plusieurs études sur les écosystèmes alimentaires, en particulier celles menées sur la conservation des produits de la pêche, ont testé l'utilisation des archées comme starter pendant la maturation des anchois salés. Aponte et al. (2010) et Tapingkae et al. (2010) ont clairement montré que l'utilisation de souches d'archées halophiles, ayant la capacité à dégrader l'histamine, en tant que starter pourrait améliorer de manière significative la sécurité et la qualité sensorielle des anchois salés (Engraulis encrasicolus). D'autre coté, Lee et al. (2015) ont isolé huit bactéries dégradant l'histamine à partir des échantillons d'anchois salés, appartenant au genre Bacillus et dont la plus prometteuse était une bactérie halotolérante. Gassem (2019) a également rapporté que Bacillus spp. et Staphylococcus spp. étaient les genres prédominants associés au poisson fermenté salé (Hout-Kasef). Récemment, Perez et al. (2021) ont montré que les membres de la famille des Halobacteriaceae et des genres bactériens Halomonas et Chomohalobacter étaient associés à la dégradation de l'histamine et leur potentiel en tant que cultures starter simples ou mixtes pour améliorer l'innocuité des aliments salés est prometteur. Différentes études ont rapporté l'isolement de nombreuses nouvelles bactéries et archées à partir de fruits de mer salés et fermentés : Lentibacillus salicampi SF-20T (Yoon et al., 2002), Lentibacillus halophilus sp. nov. (Tanasupawat et al., 2006), Halobacterium piscisalsi HPC1-2T (Yachai et al., 2008), Natrinema gari HIS40-3T (Tapingkae et al., 2008), Haloterrigena jeotgali A29T (Roh et al., 2009), Lentibacillus jeotgali GrbiT (Jung et al., 2010), Haloarcula salaria HST01-2RT et Haloarcula tradensisHST03T (Namwong et al., 2011), Halomonas shantousis SWA25T (Jiang et al., 2014), Lentibacillus lipolyticus SSKP1-9T (Booncharoen et al., 2019), et Haloargentinum marplatensis gen. nov., sp. nov. (Perez et al., 2020).

I.4.4.3. Aspect sensoriel du salage

Le salage et la maturation sont des pratiques courantes et traditionnelles utilisées pour conserver différentes espèces de petits poissons pélagiques comme le hareng, le sprat et l'anchois (Madureira et *al.*, 2009). Ce type de produits a une consistance ferme, une couleur rougeâtre, une texture juteuse, ainsi qu'une odeur et une saveur caractéristiques, résultat des changements physicochimiques et enzymatiques qui ont lieu pendant la maturation. Les mécanismes impliqués dans le développement des caractéristiques sensorielles ne sont pas entièrement compris. Les réactions impliquées dans la protéolyse et la lipolyse génèrent un

grand nombre de composés non volatils et volatils, respectivement, qui peuvent contribuer directement au goût et à l'arôme ou qui sont des précurseurs pour une oxydation ultérieure et une génération de composés aromatiques volatils (**Toldrá et Flores, 1998 ; Toldrá, 2006a, b**). L'arôme final sera plus ou moins agréable selon le type, la quantité et l'équilibre des composés volatils. **Triqui et Zouine (1999)** ont mis en évidence une forte contribution d'aldéhydes puissants à faible point d'ébullition aux notes aromatiques typiques de l'anchois salé mûr. Ces aldéhydes sont probablement générés par voie enzymatique à partir d'acides aminés libres pendant la maturation.

I.4.4.4. Rôle des enzymes dans le processus de maturation

Dans le poisson salé, la maturation est décrite par trois hypothèses. Ce sont, la théorie microbiologique, la théorie autolytique et la théorie des enzymes. Dans la théorie microbiologique, les microorganismes produisent les enzymes actives essentielles, et ces enzymes pénètrent dans la chair et contribuent au processus de maturation. La théorie autolytique décrit que la maturation est le résultat de l'activité des enzymes des muscles ou d'autres tissus, ou du tractus gastro-intestinal. Enfin, la théorie enzymatique explique la maturation du poisson salé comme ayant lieu sous l'influence de certaines enzymes, à savoir celles contenues dans le tissu musculaire, celles des organes du corps intestinal du poisson, ainsi que celles produites par les microorganismes (Giyatmi et Irianto, 2017).

Le terme de maturation ou de saumurage décrit le processus des changements protéolytiques et lipolytiques souhaitables qui repose à la fois sur des enzymes naturelles qui peuvent provenir du muscle du poisson ou du tractus intestinal (enzymes endogènes) et sur des microbes (enzymes exogènes) (Besteiro et *al.*, 2000; Skåra et *al.*, 2015). Dans ces conditions salines, la sélection d'une communauté microbienne se produit et leurs activités enzymatiques affectent la composante lipidique et protéique des tissus des poissons (Hernández-Herrero, et *al.*, 1999a ; Czerner et *al.*, 2011) pendant le processus de maturation. Ce processus détermine les changements de couleur, de jutosité, de texture, d'odeur et de saveur (Coppes et *al.*, 2002).

Pendant le processus, la protéolyse est caractérisée principalement par la dégradation des protéines musculaires par des enzymes endogènes avec augmentation des peptides et des acides aminés libres. L'activité des enzymes du tube digestif est généralement la plus importante, bien que les protéases musculaires jouent également un rôle non négligeable (**Bjørkevoll et** *al.*, **2008**). En effet, la protéolyse a un impact majeur sur l'adoucissement de la

texture et, ainsi, la tendance au ramollissement des poissons post-mortem (**Purslow, 2014**). En outre, les enzymes obtenues à partir de sources microbiennes ou tissulaires sont également utilisées pour améliorer la texture.

La lipolyse constitue aussi un groupe important de réactions pendant la transformation du poisson. Les triacylglycérols et les phospholipides sont hydrolysés par voie enzymatique pour générer des acides gras libres. Les acides gras libres générés avec des doubles liaisons sont sujets à d'autres réactions oxydatives et au développement du rancissement. Le résultat est la génération de composés aromatiques volatils qui peuvent soit améliorer l'arôme, soit contribuer à des arômes rances désagréables (**Skibsted et al., 1998**). Une teneur élevée en matières grasses est un indicateur de qualité essentiel pour tous les produits de salaison du poisson car elle est en corrélation avec des propriétés sensorielles souhaitables. Il a été démontré que l'oxydation chimique et enzymatique des acides gras insaturés et les interactions ultérieures avec les protéines, les peptides et les acides aminés libres créent la saveur typique des produits salés (**Triqui et Reineccius, 1995**).

II.1. Habitats salins et hypersalins

Sur le plan écologique, les microorganismes halophiles habitent différents écosystèmes caractérisés par une salinité supérieure à celle de l'eau de mer, c'est-à-dire 3.5% de NaCl, ces niches vont des sols hypersalins, des sources, des lacs salés, des sebkhas et d'autres habitats salins côtiers naturels, des marais, des sédiments abyssaux marins aux endophytes (**Ventosa et** *al.*, **2011**). D'autres habitats connus sont le résultat de l'intervention humaine comme les aliments salés, les saumures, les champs pétrolifères, les étangs salés et les tanneries (**Akpolat et** *al.*, **2015**).

Sur la base des paramètres physiques et des compositions chimiques, les environnements hypersalins sont principalement classés en deux catégories : les thalassohalins (provenant de l'eau de mer et contenant du chlorure de sodium comme sel prédominant) et les athalassohalins (largement dérivés de la solution de dépôts évaporatifs et contenant différents rapports d'ions (Madern et Zaccai, 2004). Les habitats naturels prédominants les mieux étudiés sont les lacs hypersalins et les salines solaires (Ventosa et *al.*, 2015 ; Saccò et *al.*, 2021). L'Algérie compte plusieurs zones humides et lacs hypersalins, avec une typologie et une écologie spécifiques, dont 50 sont classés comme sites d'importance internationale en tant que sites Ramsar (Aliat et *al.*, 2016). Ils sont caractérisés par des systèmes endoréiques typiques qui consistent en des écosystèmes lacustres salins « Sebkhas et Chotts », à savoir Sebkha Ezzemoul, Sebkha El Malah, Chott Melghir, Chott El Hodna, Chott Tinsilt (Ammara-Addou et *al.*, 2015 ; Ariech et Guechi, 2015 ; Kharroub et *al.*, 2015 ; Akmoussi-Toumi et *al.*, 2020 ; Benmebarek et *al.*, 2020).

II.2. Classification des halophiles

Bien que la vie ait également été détectée à des concentrations élevées de sels autres que le NaCl, la classification fonctionnelle du biote hypersalin est principalement basée sur les exigences et la tolérance au NaCl des différents organismes (**De la Haba et al., 2011**). Le mot halophile est dérivé du grec, signifiant « aimant le sel ». Ce sont des organismes qui aiment le sel et qui tolèrent jusqu'à 35% de NaCl (**Castillo-Carvajal et al., 2014**). Ils ont besoin d'ions sodium pour leur croissance et leur métabolisme. Selon **Kushner et Kamekura (1988**), ces microorganismes sont classés en cinq classes majeures en fonction de leur comportement vis-à-vis du sel (**Tableau 2**). Les microorganismes halotolérants sont ceux qui peuvent se développer en présence et en l'absence de concentrations élevées de sel (**Singh et al., 2019**).

Les microorganismes halophiles sont également capables de survivre et de se développer de manière optimale dans un large spectre de facteurs environnementaux extrêmes et par conséquent, peuvent être considérés comme des « polyextrêmophiles » (**Papke, 2015**). En fait, un microorganisme halophile peut également être alcaliphile, désigné comme haloalcaliphile, se développant de manière optimale à des valeurs de pH supérieures à 9, mais ne peut pas se développer à la valeur de pH presque neutre de 6.5 (**Mesbah et Wiegel, 2012**).

Tableau 2. Classification des halophiles basée sur la tolérance au sel (Kushner et Kamekura,1988).

Classe	Tolérance au NaCl (%, p/v)
Non halophiles	< 0.2 M (~ 1%)
Halophiles légers	0.2-0.5 M (~ 1-3%)
Halophiles modérés	0.5-2.5 M (~ 3-15%)
Halophiles extrêmes limites	1.5-4.0 M (~ 9-23%)
Halophiles extrême	2.5-5.2 M (~ 15-32%)

II.3. Diversités phylogénétique et métabolique

Les microorganismes halotolérants et modérément halophiles sont présents dans les trois domaines de la vie : *Archaea, Bacteria* et *Eucarya* (**Figure 2**). La distribution phylogénétique des halophiles extrêmes est plus limitée, ils appartiennent principalement aux *Archaea* (**Fig.2B**), avec seulement de rares exemples parmi les bactéries (**Fig.2A**) et parmi les champignons et les protistes (**Fig. 2C**).



Figure 2. Phylogénie à base moléculaire des trois domaines, mettant en évidence (rectangles rouges) les groupes microbiens halophiles. ^(A) Arbre bactérien modifié d'après Castelle et Banfield (2018). ^(B) Phylogénie archéenne modifiée à partir de Baker et *al.* (2020) ; les points rouges indiquent les groupes pour lesquels il n'existe pas de représentants cultivés. ^(C) Arbre eucaryote modifié d'après Burki et *al.* (2020).

II.3.1. Archaea halophiles

Les archées de la classe des *Halobacteria* au sein du phylum *Euryarchaeota* forment un groupe phylogénétiquement cohérent qui ne comprend que des halophiles. La classe est actuellement divisée en trois ordres (*Halobacteriales, Haloferacales* et *Natrialbales*) et six familles (*Halobacteriaceae, Haloarculaceae, Halococcaceae, Haloferacaceae*,

Halorubraceae et *Natrialbaceae*) (**Oren et al., 2017**). La plupart des membres du groupe sont pigmentés en rouge rosâtre en raison de la présence de pigments caroténoïdes (α -bactériorubérine et dérivés). Beaucoup possèdent également des pigments rétiniens roses tels que la bactériorhodopsine (**Oren, 2020**).

Les halobactéries sont généralement considérées comme des hétérotrophes aérobies qui utilisent des sources de carbone organique simples. Certains peuvent se développer par respiration anaérobie ou par fermentation, et la présence de la bactériorhodopsine, peut favoriser un mode de vie photohétérotrophe (Andrei et *al.*, 2012). Récemment, il a été suggéré que les membres des halobactéries peuvent également utiliser des composés arsenicaux pour des processus bioénergétiques (Ordoñez et *al.*, 2018). Des archées méthanogènes anaérobies qui vivent dans des concentrations élevées de sel ont également été signalées (Oren, 1999).

II.3.2. Bactéries halophiles

Les bactéries halophiles ont été documentées dans les phyla *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Rhodothermaeota*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et *Spirochaetes*. La plupart appartiennent au phylum des *Firmicutes* (*Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Alkalibacillus*, *Virgibacillus*, *Halobacillus*), *Actinobacteria* (*Leucobacter*, *Arthrobacter* et *Nesterenkonia*) ou *Proteobacteria* (*Halomonas*, *Chromohalobacter* et *Halovibrio*) (**Oren**, **2008**; Gonzalez-Domenech et al., 2009 ; Luo et al., 2009 ; Tang et al., 2011 ; El Hidri et al., 2013 ; Govender et al., 2013 ; Oren, 2013a).

Un groupe spécialisé d'hétérotrophes aérobies modérément halophiles est la famille des *Halomonadaceae* (classe des *Gammaproteobacteria*). Ses membres peuvent s'adapter à une large gamme de salinités (**Ventosa et al., 1998**). Un autre groupe phylogénétiquement distinct est celui des anaérobies obligatoires de l'ordre des *Halanaerobiales* (classe *Clostridia*, phylum *Firmicutes*). La plupart obtiennent de l'énergie par la fermentation des sucres et d'autres composés carbonés simples, mais certains utilisent la respiration anaérobie. D'autres groupes physiologiques existent également tels que les photoautotrophes et les chimioautotrophes (**Oren, 2013b**).

II.3.3. Eucaryotes halophiles

Les algues vertes unicellulaires *Dunaliella salina* et *D. parva* sont généralement les espèces planctoniques hypersalines les plus fréquemment observées, présentes sur une large gamme de sel allant de 9 à 250 g/L (Esmaeili Dahesht et *al.*, 2010 ; Oren, 2020). La communauté

fongique isolée est représentée par des espèces comme *Debaryomyces hansenii*, *Hortaea werneckii*, et *Wallemia ichthyophaga* (Gunde-Cimerman et *al.*, 2009) alors que les protozoaires les plus intensivement caractérisés appartiennent aux genres *Heterolobosea*, *Bicosoecida* et *Ciliophora* (Park et Simpson, 2015 ; Harding et Simpson, 2018).

II.4. Stratégies d'adaptation

Au cours des dernières décennies, l'adaptation des microorganismes halophiles à leur environnement a fait l'objet d'un intérêt croissant. Les halophiles ont développé deux principales stratégies adaptatives pour supporter la pression osmotique induite par les concentrations élevées de NaCl dans les environnements qu'ils habitent (Madigan et Oren, 1999; Oren, 2002).

II.4.1. Stratégie Salt-in

L'une des stratégies utilisées par les microorganismes pour atteindre l'équilibre osmotique au sein de milieux très salés consiste à accumuler de fortes concentrations intracellulaires de sels (Gunde-Cimerman et *al.*, 2018). Quelques groupes de procaryotes accumulent du potassium et du chlorure en concentrations molaires dans un processus nécessitant de l'énergie ; les concentrations intracellulaires de sodium sont toujours maintenues relativement faibles (McGenity et Oren, 2012). Seuls quelques groupes d'halophiles utilisent cette stratégie « high-salt-in », les plus importants étant les membres aérobies des *Halobacteriaceae* (*Archaea*), *Salinibacter* (*Bacteria*), et les *Halanaerobiales* anaérobies (*Bacteria*) (Weinisch et *al.*, 2018). Les archées accumulent le potassium intracellulaire et excluent le sodium, tandis que les bactéries accumulent le sodium plutôt que le potassium (Delgado-Garcia et *al.*, 2012).

II.4.2. Stratégie Salt-out

C'est la stratégie de réponse au stress hyper-osmotique la plus répandue. Ce mécanisme adaptatif fonctionne en accumulant dans la cellule des solutés organiques de faible poids moléculaire, tout en excluant autant que possible les sels du cytoplasme, afin d'équilibrer la pression osmotique. Ces petites molécules organiques et osmotiquement actives sont appelées « solutés compatibles » (Oren, 1999). Ils peuvent être synthétisés *de novo* ou importés du milieu environnant (DasSarma et DasSarma, 2012). Ces solutés peuvent agir comme stabilisateurs des structures biologiques et permettent aux cellules de s'adapter non seulement aux sels mais aussi aux conditions de chaleur, de dessiccation, de froid ou même de congélation (Delgado-Garcia et *al.*, 2012 ; Jiang et *al.*, 2015). Ils forment principalement

une couche d'eau générant une hydratation cellulaire en présence d'une forte teneur en sel dans le milieu (Ramírez et al., 2004).

La plupart des bactéries halotolérantes et modérément halophiles utilisent largement la stratégie « salt-out », elles accumulent l'ectoïne ou l'hydroxyectoïne comme solutés compatibles prédominants. D'autres types d'osmolytes comprennent la glycine, la bétaïne et d'autres glycérols neutres (**Siglioccolo et** *al.*, **2011**). Chez certains halophiles, une combinaison de mécanismes adaptatifs peut fonctionner (**DasSarma et DasSarma, 2015**).

II.5. Potentiel biotechnologique des bactéries halophiles et haloalcaliphiles

Les études sur les halophiles/haloalcaliphiles découlent de leur importance dans l'écologie des habitats salins et de leur pertinence dans diverses applications industrielles (**Rothschild et Mancinelli 2001; Karan et al., 2012**). Les halophiles/haloalcaliphiles peuvent servir de source de nombreuses biomolécules uniques, telles que des enzymes stables, des biopolymères, des solutés compatibles, des exo-polysaccharides et des lipides spéciaux, des pigments caroténoïdes et des protéines rétiniennes. Ils peuvent également être utiles pour les processus de bioremédiation, de biofermentation et de biodégradation des polluants toxiques (**Peyton et al., 2004 ; Dawson et al., 2012**), la désalinisation des eaux usées et d'autres nouvelles applications en agriculture et en médecine (**DasSarma et al., 2010**).

II.5.1. Enzymes halophiles et haloalcaliphiles

Les enzymes halophiles ou haloenzymes constituent l'application biotechnologique la plus importante. Les hydrolases constituent la principale classe d'enzymes produites par les microorganismes halophiles (Karan et al. 2012). L'intérêt pour les enzymes industrielles capables de résister à des conditions difficiles a fortement augmenté au cours de la dernière décennie. Des efforts considérables ont été déployés pour étudier les enzymes extracellulaires tolérantes au sel des bactéries halotolérantes, modérément halophiles et haloalcaliphiles, en vue de développer une nouvelle ère dans les processus biotechnologiques. Il est fascinant de constater que plusieurs enzymes provenant de microorganismes halophiles présentent également une « nature polyextrêmophile » et restent actives/stables en présence d'un pH alcalin, d'une température élevée et d'un milieu non aqueux, en plus de leur activité en présence de sel, leur stabilité étant modulée par le sel (Enache et Kamekura 2010 ; Kumar et al., 2012 ; Munawar et Engel, 2013 ; Sinha et Khare, 2014).

Les haloalcaliphiles possèdent une gamme de biocatalyseurs qui leur permettent de survivre dans des conditions extrêmes de salinité et de pH alcalin (**Debashish et** *al.*, 2005). Parmi les

enzymes, les protéases, les carbohydrases et les peroxydases sont les plus explorées (Essghaier et *al.*, 2012 ; Pandey et *al.*, 2012). Les caractéristiques uniques des enzymes se reflètent dans leur stabilité à fonctionner dans des conditions physico-chimiques élevées, telles que le pH et le sel (Purohit et Singh, 2011).

Ces enzymes ont également un potentiel industriel pour la fermentation alimentaire, les compléments pour l'industrie alimentaire, textile et pharmaceutique, l'alimentation animale (Sekar et al., 2016), les détergents pour le linge (pour détacher le sang, l'encre et le café (Sekar et al., 2016), l'industrie du cuir (Setati, 2010), la bioremédiation (traitement des eaux usées salines et hypersalines) (Mainka et al., 2021), le traitement des champs pétrolifères et des déchets alimentaires (De Lourdes Moreno et al., 2013 ; An et al., 2018), la biodégradation (Adetitun et al., 2020 ; Farag et al., 2021), la production de biocarburants (Amoozegar et al., 2019), les stabilisateurs de biomolécules et les agents de protection contre le stress (Waditee-Sirisattha et al., 2016). Il a même été mentionné que ces enzymes ont différentes propriétés immunologiques, et peuvent être utilisées pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë et des cellules tumorales (Shirazian et al., 2016).

II.5.1.1. Adaptation au sel

Les protéines halophiles se distinguent de leurs homologues non halophiles en présentant une instabilité remarquable dans des solutions à faible concentration en sel et en maintenant des conformations solubles et actives dans des concentrations élevées en sel, par exemple jusqu'à 5 M de NaCl (**Madern et al., 2000**). L'exigence d'une concentration élevée en sel pour la stabilisation des enzymes halophiles est due à une liaison de faible affinité du sel à des sites spécifiques sur la surface du polypeptide plié, stabilisant la conformation active de la protéine (**Mevarech et al., 2000**). D'une part, il a été observé que le chlorure de sodium joue un rôle dans la stimulation de processus biologiques importants tels que la transcription, la traduction et l'activité de transport des enzymes halophiles (**Averhoff et Mueller, 2010**), et d'autre part, il a été proposé que les sels exercent un criblage de charge, réduisant la répulsion électrostatique et renforçant l'interaction hydrophobe, favorisant ainsi une structure repliée compacte des protéines halophiles (**Karan et al., 2011**).

II.5.1.2. Propriétés générales

En général, les enzymes halophiles signalées sont sécrétées dans l'environnement extracellulaire tout au long du cycle de croissance des bactéries halophiles en présence de substrats appropriés qui agissent comme des inducteurs directs du gène respectif selon
l'enzyme produite (Setati, 2010). L'étude des enzymes halophiles se concentre, d'une part, sur leurs caractéristiques structurelles particulières, car jusqu'à présent, certains mécanismes et propriétés n'ont pas été entièrement compris, et d'autre part, sur les applications possibles dans différents domaines industriels (Liszka et *al.*, 2012). La clé de la stabilité des enzymes halophiles dans des conditions extrêmes est fournie par deux caractéristiques structurelles importantes : (a) une augmentation des acides aminés acides situés à la surface de la protéine, et (b) des interactions entre le sel et les molécules qui permettent un « modèle de stabilisation par solvatation » par rapport au milieu hypersalin (Sinha et Khare, 2014; DasSarma et DasSarma, 2015).

II.5.1.3. Composition en acides aminés

La négativité frappante du protéome halophile a été révélée pour la première fois par le séquençage du génome d'*Halobacterium* sp. NRC-1 (**Ng et al., 1998 ; Kennedy et al., 2001**). Sa charge négative est particulièrement due à une faible composition en résidus d'acides aminés hydrophobes à chaîne latérale (phénylalanine, isoleucine et leucine), une faible proportion d'autres petits résidus hydrophobes (glycine, alanine, sérine et thréonine), un déficit en acides aminés basiques (lysine et arginine), un noyau hydrophobe et un excès d'acides aminés acides (acide glutamique et aspartique) en surface qui augmentent les hélices dans la structure de la protéine (Graziano et Merlino, 2014 ; DasSarma et DasSarma, 2015).

En utilisant la structure modèle de la malate déshydrogénase de l'archée halophile (*Halobacterium salinarum*; hsMDH) et la structure aux rayons X de la bactérie mésophile (*E. coli*; ecMDH), **Bandyopadhyay et al. (2019)**, ont rapporté que la surface de la première a non seulement une plus grande abondance d'acides aminés acides mais a également des résidus basiques, qui sont entièrement utilisés dans la formation de ponts salins dans la hsMDH, en montrant leur abondance dans le noyau de la protéine. Globalement, ces ponts salins dans la hsMDH semblent jouer un rôle important dans l'haloadaptation de la protéine en structure tertiaire dans des conditions hautement salines.

Les mécanismes d'adaptation des protéines haloalcaliphiles n'ont pas été étudiés de manière approfondie. Il est possible que les organismes haloalcaliphiles emploient des stratégies communes aux halo- et alcaliphiles, mais de nouveaux mécanismes d'adaptation sont également possibles. **Popinako et al. (2017)** ont réalisé une analyse comparative des séquences d'acides aminés et des structures des octaheme nitrite réductases ONRs des bactéries haloalcaliphiles et de leurs homologues des bactéries neutrophiles non halophiles (**Figure 3**). Ils ont constaté que les stratégies d'adaptation suivantes ont été observées : (1) stratégies spécifiques aux protéines halophiles et alcaliphiles (augmentation du nombre de résidus aspartate et glutamate et diminution du nombre de résidus lysine à la surface de la protéine), (2) stratégies spécifiques aux protéines halophiles (augmentation de la teneur en arginine et diminution du nombre de résidus hydrophobes à la surface de la protéine accessible au solvant), (3) stratégies spécifiques aux protéines aux protéines alcaliphiles (augmentation de la surface des contacts hydrophobes inter-sous-unités). Ils ont également révélé un mécanisme d'adaptation unique inhérent aux ONR des bactéries du genre *Thioalkalivibrio*, une augmentation dans le noyau, d'une part du nombre de résidus de tryptophane et de phénylalanine et d'autre part, du nombre de résidus de petites chaînes latérales, comme l'alanine et la valine.



Figure 3. Les régions hydrophobes sont mises en évidence en orange, les régions hydrophiles en bleu. Les substitutions conservées sur la surface accessible aux solvants sont indiquées par des flèches. L'encart montre la localisation de la surface accessible par solvant dans l'hexamère. ^(A) Surface accessible au solvant de GsNiR et ^(B) TvNiR avec les potentiels électrostatiques relatifs de surface. La surface de TvNiR est chargée négativement (**Popinako et al., 2017**)

GsNiR : octaheme nitrite réductase de *Geobacter sulfurreducens*; TvNiR : octaheme nitrite réductase de *Thioalkalivibrio nitratireducens* ; **A**-Alanine (Ala) ; **V**-Valine (Val) ; **Y**-Tyrosine (Tyr) ; **K**-Lysine (Lys) ; **R**-Arginine (Arg) ; **E**-Glutamate (Glu) ; **D**-Aspartate (Asp).

La recherche sur des amylases microbiennes possédant des activités stabilités améliorées est un travail difficile qui peut soutenir commercialement différentes industries (Sahoo et *al.*, 2016). Dans ce contexte, l'isolement et le criblage d'organismes halophiles producteurs d'amylase de trait désiré est un domaine de recherche contemporain. L'utilisation de ces enzymes dans les bioprocédés présente l'avantage d'obtenir des activités optimales à des concentrations élevées de sel. Les amylases halophiles pourraient également être particulièrement résistantes aux solvants organiques car elles fonctionnent dans des conditions où l'activité de l'eau est faible (Kumar et Khare, 2015).

III.1. Amidon

L'amidon est la principale réserve alimentaire polysaccharidique dans la nature après la cellulose. Il sert de source importante de nutrition pour les autres organismes vivants (**Sharma et Satyanarayana, 2013**). Il est composé d'un grand nombre d'unités de glucose reliées par des liaisons glycosidiques. Il se compose de deux types de molécules : l'amylose et l'amylopectine. L'amylose est un polymère linéaire, insoluble dans l'eau, de glucose relié par des liaisons α -1,4, tandis que l'amylopectine est un polysaccharide ramifié, soluble dans l'eau, avec de courtes chaînes linéaires liées à l' α -1,4 de 10 à 60 unités de glucose et des chaînes latérales liées à l' α -1,6 de 15 à 45 unités de glucose. En général, l'amidon est composé d'amylose et d'amylopectine dans une proportion de 25 à 28% et de 72 à 75%, respectivement (**Sindhu et al., 2017**).

Les amylases sont les enzymes qui décomposent l'amidon, ou le glycogène. Bien que les amylases puissent être dérivées de plusieurs sources, notamment des plantes, des animaux et des microorganismes, les enzymes microbiennes répondent généralement aux demandes industrielles (Alariya et *al.*, 2013 ; Panneerselvam et Elavarasi, 2015). Ces enzymes ont été isolées à partir de nombreuses sources microbiennes, notamment des bactéries, des champignons et certains actinomycètes, qui sont résistantes à une concentration élevée de sel et aux hautes valeurs de température et de pH (Abdu Al-Zazaee et *al.*, 2011). Les principaux avantages de l'utilisation de microorganismes pour la production d'amylases sont d'une part la capacité économique de production en vrac et, d'autre part, le fait que les microbes sont faciles à manipuler pour obtenir des enzymes aux caractéristiques souhaitées (Abdel-Fattah et *al.*, 2013 ; Panneerselvam et Elavarasi, 2015).

III.2. Classification des amylases

Trois types d'amylase ont été divisés par **Ekunsaumi** (2002) en fonction de leur capacité à décomposer l'amylose. Il s'agit de l' α -amylase, de la β -amylase et de la glucoamylase ou de l'amyloglucosidase.

III.2.1. α-amylase

L' α -amylase (α -1,4 D-glucan-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) est une enzyme extracellulaire ayant la capacité de catalyser l'hydrolyse des liaisons α -1,4 glycosidiques des molécules d'amidon, produisant des molécules simples contenant des unités de glucose (**Zhang et** *al.*, **2017**). Elles appartiennent à la famille 13 (GH-13) du groupe d'enzymes des glycosides hydrolases (**Sivaramakrishnan et** *al.*, **2006**). La présence de cette endoenzyme extracellulaire a été trouvée dans divers groupes de microorganismes halophiles, dont principalement les bactéries, les champignons, les bactéries marines et les actinobactéries (**Tableau 3**).

III.2.2. β-amylase

La β -amylase (EC 3.2.1.2) produit du maltose à partir de l'amidon en hydrolysant les liaisons α -1,4-glucanes. Jusqu'à présent, la présence de la β -amylase n'a été signalée que chez deux bactéries halophiles (**Tableau 3**). Ces deux β -amylases sont issues de deux bactéries modérément halophiles, *Halobacillus* sp. souche LY9 (**Li et Yu, 2011**) et *Salimicrobium halophilum* souche LY20 (**Li et Yu, 2012a**).

III.2.3. Glucoamylase

La glucoamylase (EC 3.2.1.3) est une autre enzyme hydrolysant l'amidon qui catalyse le clivage séquentiel des liaisons glycosidiques α -1,4 et α -1,6 des extrémités non réductrices de l'amidon et des oligosaccharides apparentés et produit du glucose comme seul produit final (**Xu et al., 2016**). Les glucoamylases à des fins industrielles sont principalement produites à partir de champignons filamenteux, tels que les membres des genres *Aspergillus* et *Rhizopus* (**Amoozegar et al., 2019**).

Туре	Nom de microorganisme	Туре	Souche	Poids de	Stabi	Références		
d'amylase				l'enzyme (kDa)	Intervalle de Température (optimum) (°C)	Intervalle de pH (optimum)	Intervalle de NaCl (optimum) (M)	- -
	Haloferax mediterranei	AH		58	50-60 (60)	7-8	2-4 (3)	Perez-Pomares et <i>al.</i> (2003)
-	Haloarcula sp.	AH	S-1	70	50	7	4.3	Fukushima et <i>al.</i> (2005)
-	Haloarcula hispanica	AH		43.3	37-60 (50)	3-9 (6.5)	0-5 (4-5)	Hutcheon et al. (2005)
-	Halorubrum xinjiangense	AH		60	(70)	7-9 (8.5)	(4)	Moshfegh et al. (2013)
-	Natronococcus sp.	AH	Ah-36	74	+50 (55)	6-8 (8.5)	2.5	Kobayashi et al. (1992)
α-	Chromohalobacter sp.	BH	TVSP 101	72 et 62	30-85 (65)	(9)	0-3.4	Prakash et <i>al.</i> (2009)
amylase	Salimicrobium halophilum	BH	LY20	81	30-80 (70)	6-12 (10)	0.4-3.4 (1.7)	Li et Yu (2012a)
•	Thalassobacillus sp.	BH	LY18	31	30-90 (70)	6-12 (9)	0-3.4 (1.7)	Li et Yu (2012b)
-	Halothermothrix orenii	BHM		52 et 72.3	(65)	(7.5)	Jusqu'à 4.5 (0.9)	Mijts et Patel (2002)
-	Kocuria varians	BHM		77	NR	NR	1-2	Yamaguchi et <i>al.</i> (2011)
	Halomonas meridiana	BHM		NR	(37)	7-10 (7)	Jusqu'à 5.4 (1.7)	Coronado et al. (2000)
	Marinobacter sp.	BHM	EMB8	72	(45)	6-11 (7)	0.1-3.4 (0.1)	Kumar et Khare (2012)
	Acinetobacter sp.	BHM		55 et 65	(50-55)	(7)	(0.2-0.6)	Onishi et Hidaka (1978)

Tableau 3. Enzymes amylasiques (α -amylase, β -amylase et glucoamylase) provenant de microorganismes halophiles (**Amoozegar et** *al.*, **2019**).

AH, Archée Halophile; BH, Bactérie Halophile; BHM, Bactérie Halophile Modérée; NR, Non Rapporté.

Tableau 3. Enzymes amylasiques (α -amylase, β -amylase et glucoamylase) provenant de microorganismes halophiles (suite) (Amoozegar et *al.*, 2019).

d'amylase Intervalle de (kDa) Intervalle de (kDa) Intervalle de (kDa) Intervalle de pH (optimum) (°C) Intervalle de pH (optimum) Intervalle de NaCl (optimum) (M) u-amylase Micrococcus halobius BHM 89 (50-55) (6-7) (0.25) Onishi et Sonoda (1979) Halomonas sp. BHM AAD21 NR 35-60 (50) 4-7 (6.5) 0.4 Uzyol et al. (2012) Bacillus dipsosauri BHM DD1 30 (< 60) (6.5) NR Deutch (2002) Halobacillus sp. BHM MA-2 NR 50 (10-70) 7.5-8.5 (7.8) (0.9) Amoozegar et al. (2003) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2016) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-4 (0.5) Shaffei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qint al. (2014) Streptomyces sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2009) (2009) <tr< th=""><th>Туре</th><th rowspan="2">Nom de microorganisme</th><th>Туре</th><th rowspan="2">Souche</th><th rowspan="2">Poids de l'enzyme</th><th colspan="3">Stabilité et activité de l'enzyme</th><th>Références</th></tr<>	Туре	Nom de microorganisme	Туре	Souche	Poids de l'enzyme	Stabilité et activité de l'enzyme			Références
(kDa) Température (optinum) (°C) pH (optinum) NaCl (optinum) (M) a-amylase Micrococcus halobius BHM 89 (50-55) (6-7) (0.25) Onishi et Sonoda (1979) Halomonas sp. BHM AAD21 NR 35-60 (50) 4-7 (6.5) 0.4 Uzyol et al. (2012) Bacillus dipsosauri BHM DD1 30 (< 60) (6.5) NR Deutch (2002) Halobacillus sp. BHM MA-2 NR 50 (10-70) 7.5-8.5 (7.8) (0.9) Amoozeagre et al. (2003) Bacillus sp. BHM TSCVKK NR 40-70 (55) 6.5-9.5 (7.5) 1.7-3.4 (1.7) Kiran et Chandra (2008) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Succharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2011) Streptomyce	d'amylase					Intervalle de	Intervalle de	Intervalle de	-
(optimum) (°C) (optimum) (M) a-amylase Micrococcus halobius BHM 89 (50-55) (6-7) (0.25) Onishi et Sonoda (1979) Halomonas sp. BHM AAD21 NR 35-60 (50) 4-7 (6.5) 0.4 Uzyol et al. (2012) Bacillus dipsosauri BHM DD1 30 (< 60) (6.5) NR Deutch (2002) Halobacillus sp. BHM MA-2 NR 50 (10-70) 7.5-8.5 (7.8) (0.9) Amoozegar et al. (2003) Bacillus sp. BHM TSCVKK NR 40-70 (55) 6.5-9.5 (7.5) 1.7-3.4 (1.7) Kiran et Chandra (2008) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2018) Nesterenkonia sp. BHM F 100-106 (45) 6-7.5 (7.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9<					(kDa)	Température	pН	NaCl (optimum)	
a-amylase Micrococcus halobius BHM 89 (50-55) (6-7) (0.25) Onishi et Sonoda (1979) Halomonas sp. BHM AAD21 NR 35-60 (50) 4-7 (6.5) 0.4 Uzyol et al. (2012) Bacillus dipsosauri BHM DD1 30 (< 60) (6.5) NR Deutch (2002) Halobacillus sp. BHM MA-2 NR 50 (10-70) 7.5-8.5 (7.8) (0.9) Amoozegar et al. (2003) Bacillus sp. BHM MA-2 NR 40-70 (55) 6.5-9.5 (7.5) 1.7-3.4 (1.7) Kiran et Chandra (2008) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2010, 2011, 2012) Bacillus sp. BHM F 100-106 (45) 6-7.5 (7.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th></th> <th>(optimum) (°C)</th> <th>(optimum)</th> <th>(M)</th> <th></th>						(optimum) (°C)	(optimum)	(M)	
$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	α-amylase	Micrococcus halobius	BHM		89	(50-55)	(6-7)	(0.25)	Onishi et Sonoda (1979)
Bacillus dipsosauri BHM DD1 30 (<60) (6.5) NR Deutch (2002) Halobacillus sp. BHM MA-2 NR 50 (10-70) 7.5-8.5 (7.8) (0.9) Amoozegar et al. (2003) Bacillus sp. BHM TSCVKK NR 40-70 (55) 6.5-9.5 (7.5) 1.7-3.4 (1.7) Kiran et Chandra (2008) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2010, 2011, 2012) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM F 100-106 (45) 6-7.5 (7.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 <t< td=""><td></td><td>Halomonas sp.</td><td>BHM</td><td>AAD21</td><td>NR</td><td>35-60 (50)</td><td>4-7 (6.5)</td><td>0.4</td><td>Uzyol et al. (2012)</td></t<>		Halomonas sp.	BHM	AAD21	NR	35-60 (50)	4-7 (6.5)	0.4	Uzyol et al. (2012)
Halobacillus sp. BHM MA-2 NR 50 (10-70) 7.5-8.5 (7.8) (0.9) Amoozegar et al. (2003) Bacillus sp. BHM TSCVKK NR 40-70 (55) 6.5-9.5 (7.5) 1.7-3.4 (1.7) Kiran et Chandra (2008) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2008) Bacillus sp. BHM F 100-106 (45) 6-7.5 (7.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2019) Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 <90 (80) 9-11 (9) 1.7-6.8 (5.1) Ali et al. (2015) Engyodontium album CH TISTR 3645 50 40-60 (60) 5-9 (9) 0-5.1 (5.1) Ali et al. (2014)		Bacillus dipsosauri	BHM	DD1	30	(< 60)	(6.5)	NR	Deutch (2002)
Bacillus sp. BHM TSCVKK NR 40-70 (55) 6.5-9.5 (7.5) 1.7-3.4 (1.7) Kiran et Chandra (2008) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2008) Nesterenkonia sp. BHM F 100-106 (45) 6-7.5 (7.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2011) Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 <90 (80)		Halobacillus sp.	BHM	MA-2	NR	50 (10-70)	7.5-8.5 (7.8)	(0.9)	Amoozegar et al.
Bacillus sp. BHM TSCVKK NR 40-70 (55) 6.5-9.5 (7.5) 1.7-3.4 (1.7) Kiran et Chandra (2008) Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2008) Nesterenkonia sp. BHM F 100-106 (45) 6-7.5 (7.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM A9 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2019) Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 <90 (80) 9-11 (9) 1.7-6.8 (5.1) Ali et al. (2015) Engyodontium album CH TISTR 3645 50 40-60 (60) 5-9 (9) 0-5.1 (5.1) Ali et al. (2014)									(2003)
Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2008) Nesterenkonia sp. BHM F 100-106 (45) 6-7.5 (7.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM F 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2011) Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 <90 (80)		Bacillus sp.	BHM	TSCVKK	NR	40-70 (55)	6.5-9.5 (7.5)	1.7-3.4 (1.7)	Kiran et Chandra
Bacillus sp. BHM AB68 NR 20-90 (50) 5-10.5 (10.5) 0-3.4 (0.9) Aygan et al. (2008) Nesterenkonia sp. BHM F 100-106 (45) 6-7.5 (7.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2019) Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 <90 (80)									(2008)
Nesterenkonia sp. BHM F 100-106 (45) 6-7.5 (7.5) 0-4 (0.5) Shafiei et al. (2010, 2011, 2012) Zunongwangia profunda BM 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2011) Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 <90 (80)		Bacillus sp.	BHM	AB68	NR	20-90 (50)	5-10.5 (10.5)	0-3.4 (0.9)	Aygan et <i>al</i> . (2008)
Zunongwangia profunda BM 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2011) Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 <90 (80)		Nesterenkonia sp.	BHM	F	100-106	(45)	6-7.5 (7.5)	0-4 (0.5)	Shafiei et al. (2010,
Zunongwangia profunda BM 66 0-35 (35) (7) (1.5) Qin et al. (2014) Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2011) Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 <90 (80)									2011, 2012)
Saccharopolyspora sp. AM A9 66 (55) 8-12 (11) 1.8-2.6 (1.8) Chakraborty et al. (2011) Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 < 90 (80)		Zunongwangia profunda	BM		66	0-35 (35)	(7)	(1.5)	Qin et al. (2014)
Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 < 90 (80)		Saccharopolyspora sp.	AM	A9	66	(55)	8-12 (11)	1.8-2.6 (1.8)	Chakraborty et al.
Streptomyces sp. AM D1 66 37-85 (45) 7-12 (9) 1.2-2 (1.2) Chakraborty et al. (2009) Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 < 90 (80)									(2011)
Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 < 90 (80) 9-11 (9) 1.7-6.8 (5.1) Ali et al. (2015) Engyodontium album CH TISTR 3645 50 40-60 (60) 5-9 (9) 0-5.1 (5.1) Ali et al. (2014)		Streptomyces sp.	AM	D1	66	37-85 (45)	7-12 (9)	1.2-2 (1.2)	Chakraborty et al.
Aspergillus penicillioides CH TISTR 3639 42 < 90 (80) 9-11 (9) 1.7-6.8 (5.1) Ali et al. (2015) Engyodontium album CH TISTR 3645 50 40-60 (60) 5-9 (9) 0-5.1 (5.1) Ali et al. (2014)									(2009)
Engyodontium album CH TISTR 3645 50 40-60 (60) 5-9 (9) 0-5.1 (5.1) Ali et al. (2014)		Aspergillus penicillioides	СН	TISTR 3639	42	< 90 (80)	9-11 (9)	1.7-6.8 (5.1)	Ali et al. (2015)
		Engyodontium album	СН	TISTR 3645	50	40-60 (60)	5-9 (9)	0-5.1 (5.1)	Ali et al. (2014)

BHM, Bactérie Halophile Modérée; BM, Bactérie Marine; AM, Actinomycète Marine; CH, Champignon Halophile; NR, Non Rapporté.

Tableau 3. Enzymes amylasiques (α -amylase, β -amylase et glucoamylase) provenant de microorganismes halophiles (suite) (Amoozegar et *al.*, 2019).

Туре	Nom de	Туре	Souche	Poids de	Stabilité et activité de l'enzyme			Références
d'amylase	microorganisme			l'enzyme (kDa)	Intervalle de Température (optimum) (°C)	Intervalle de pH (optimum)	Intervalle de NaCl (optimum) (M)	-
β-amylase	Halobacillus sp.	BHM	LY9	NR	50-70 (60)	4-12 (8)	0.9-3.4 (1.7-2.1)	Li et Yu (2011)
	Salimicrobium	BHM	LY20	81	(70)	6-12 (10)	0.4-3.4 (1.7)	Li et Yu (2012a)
	halophilum							
Gluco-	Halorubrum sp.	AH	Ha25	140	(50)	(7-7.5)	0-4.5	Siroosi et al.
amylase								(2014)
	Halolactibacillus sp.	BH	SK71	78.5	0-100 (70)	7-12 (8)	0-3.4 (1.3)	Yu et Li (2014)
	Alkalilimnicola sp.	BH	NM-DCM-1	80	47-57 (55)	8.5-10.5 (9.5)	1.7-2.6 (2)	Mesbah et Wiegel (2018)

BHM, Bactérie Halophile Modérée; AH, Archée Halophile; BH, Bactérie Halophile; NR, Non Rapporté.

III.4. Production des amylases par les halophiles

Les producteurs d'amylase étaient principalement des bâtonnets à Gram positif, suivis de bâtonnets à Gram négatif et de cocci à Gram positif. Parmi les bactéries, ils appartenaient aux genres *Salinivibrio, Bacillus, Halomonas, Halobacillus, Gracilibacillus, Thalassobacillus, Oceanobacillus, Chromohalobacter* et *Marinobacter* (Sanchez-Porro et *al.*, 2003 ; Kiran et Chandra, 2008 ; Prakash et *al.*, 2009 ; Rohban et *al.*, 2009 ; Kumar et *al.*, 2012 ; Kumar et Khare, 2015). Des études de production et de caractérisation plus poussée de très peu d'amylases halophiles ont été réalisées (Kiran et Chandra, 2008 ; Prakash et *al.*, 2009 ; Kumar et *al.*, 2012 ; Kumar et *al.*, 2012 ; Kumar et Khare, 2015). Chez les halophiles, la production d'amylase est généralement dépendante de la croissance, commençant en phase exponentielle et atteignant son maximum en phase stationnaire (Kumar et Khare, 2015). Une exception à cette règle a été observée dans le cas de la production d'amylase d'*Halorubrum xinjiangense*, qui était indépendante de la croissance, commençant au début de la phase exponentielle et atteignant son maximum au milieu de cette phase (Moshfegh et *al.*, 2013).

III.4.1. Méthodes de production

Deux méthodes de fermentation, telles que la fermentation en milieu solide (SSF) et la fermentation submergée (SmF), sont utilisées pour la production d' α -amylase (**Balakrishnan et al., 2021**). La SSF est une nouvelle méthode, tandis que SmF est une méthode traditionnelle de production d'enzymes à partir de microorganismes, utilisée depuis plus longtemps. Dans la SmF, les produits finaux de la fermentation sont libérés dans le bouillon de fermentation et l'utilisation du substrat est très rapide d'où la nécessité de fournir du substrat en continu (**Dheeman et al., 2011**). Généralement, la SmF est réalisée en utilisant des milieux synthétiques, incorporant des constituants du milieu tels que le bouillon nutritif et l'amidon soluble, ainsi que d'autres composants, qui sont très coûteux. Le remplacement de ces constituants par des sources de carbone et d'azote ainsi que par des nutriments moins coûteux permettrait de réduire les coûts du processus. Les sous-produits agricoles offrent des avantages potentiels à cet égard (**Sivaramakrishnan et al., 2006**).

La fermentation en milieu solide (SSF) est définie comme le processus dans lequel la croissance des microorganismes est effectuée sur des substrats solides avec une quantité négligeable d'eau libre ou d'eau à écoulement libre (**Pandey et** *al.*, **2001**). La SSF est préférée à la SmF, compte tenu de la quantité d'eau nécessaire, du rendement enzymatique et de l'utilisation de l'énergie (**Balakrishnan et** *al.*, **2021**). Dans la SSF, les déchets riches en nutriments sont considérés comme les meilleurs substrats et ils sont consommés très

lentement et constamment. Plusieurs agro-résidus tels que le son de blé, le son de riz, les pelures de légumes, les pelures de fruits, la bagasse de manioc et les résidus extraits des huiles végétales sont utilisés comme substrats pour la production d' α -amylase (**Yimer et Tilahun**, **2018**). Les principaux avantages de la SSF sont la facilité de manipulation, la récupération d'une concentration plus élevée de produits et la génération d'un effluent moins important (**Couto et Sanromán, 2006**). Par conséquent, la SSF est considérée comme une méthode prometteuse pour la production commerciale d'enzymes en raison de son processus de production rentable (**Kunamneni et al., 2005**).

Les niveaux de production d'α-amylase chez les halophiles sont généralement faibles et très peu d'études ont été réalisées. Maximiser le rendement enzymatique sans augmenter le coût de production est de première importance en enzymologie industrielle. Une production élevée d'enzymes peut être atteinte soit par la manipulation génétique des microbes, soit par l'optimisation des procédés. L'optimisation des paramètres de fermentation a été traditionnellement utilisée dans le développement de bioprocédés économiquement viables pour répondre aux demandes industrielles (**Kar et al., 2008**). La sélection des composants de milieu appropriés et de paramètres de culture adéquats peut améliorer considérablement le rendement enzymatique (**Trabelsi et al., 2019**). Les facteurs importants qui déterminent le bioprocédé sont la période d'incubation, la température, le pH, l'agitation, la taille de l'inoculum, les sels et les ions métalliques, les sources de carbone et d'azote (**Elmansy et al., 2018**).

III.4.2. Facteurs influençant la production de l'a-amylase

III.4.2.1. Effet du pH, de la température et de l'agitation

La température affecte la croissance de l'organisme qui, à son tour, influence la production d'enzymes (**Gupta et al., 2003**). La température optimale dépend donc de la nature de la culture, qu'elle soit thermophile ou mésophile. De même, le pH du milieu de fermentation joue également un rôle important. Un changement de pH affecte la croissance ainsi que la stabilité du produit (**Sindhu et al., 2017**). En fonction du pH optimal d'activité, les α -amylases sont classées comme acides, neutres et alcalines (**Sharma et Satyanarayana, 2013**). Dans la plupart des fermentations, l'agitation ainsi que le taux de transfert d'oxygène dans le milieu sont des facteurs importants qui influencent la morphologie cellulaire et la formation de produits (**Amanullah et al., 1999**). On pense généralement qu'une agitation plus importante est préjudiciable à la croissance cellulaire, ce qui pourrait diminuer la production

d'enzymes. Des intensités d'agitation allant jusqu'à 300 rpm sont normalement employées pour la production d' α -amylase à partir de divers microorganismes (**Ellaiah et** *al.*, **2002**).

L'effet des facteurs ci-dessus n'a pas été beaucoup étudié pour la production d'amylase chez les halophiles. *Halobacillus* sp. a produit un maximum d'amylase à un pH de 7.8, une température de 30°C et une vitesse d'agitation de 200 rpm (**Amoozegar et** *al.*, **2003**). En général, un pH légèrement alcalin et une température d'environ 30-37°C favorisent la production d'amylase (**Kumar et Khare, 2015**).

III.4.2.2. Effet de la taille de l'inoculum

La taille de l'inoculum a un effet significatif sur la croissance ainsi que sur la production d'enzymes (**Sivakumar et al., 2012**). L'augmentation ou la diminution de la taille des inocula au-delà du niveau optimal affecte la production d'enzymes. Comme il n'y a pas de taille d'inoculum bien définie pour la production optimale d'amylase, des résultats différents ont été obtenus entre les différents organismes. 1% s'est avéré être le meilleur volume d'inoculum pour la production d'amylase par *Marinobacter* sp. EMB8 (**Kumar et Khare, 2015**).

III.4.2.3. Effet des sources de carbone

La production d'α-amylase pourrait être constitutive ou inductible (Sindhu et al., 2017). Les amylases des halophiles sont principalement inductibles. Elles s'expriment en présence des sources de carbone appropriées telles que l'amidon, la dextrine et le maltose (Kumar et al., 2016). Contrairement à cela, l'amylase d'*Halobacillus* sp. souche MA-2 était exprimée de manière constitutive (Amoozegar et al., 2003). Le glucose a agi comme un répresseur de la production dans le cas de *Natronococcus* sp. souche Ah-36 (Kobayashi et al., 1992), et *Halomonas meridiana* (Coronado et al., 2000). Parmi les inducteurs, l'amidon est le meilleur, il favorise la production d'amylase dans le cas d'*Halomonas meridiana* (Coronado et al., 2000) et de *Marinobacter* sp. EMB8 (Kumar et Khare, 2015), tandis que pour *Halobacillus* sp. souche MA-2 (Amoozegar et al., 2003) et *Bacillus* sp. souche TSCVKK (Kiran et Chandra, 2008), la dextrine a donné le meilleur résultat.

III.4.2.4. Effet des sources alternatives de carbone

La valorisation de substrats à faible coût pour la production de produits à valeur ajoutée prend de l'ampleur, car les produits de source bio atteignent un poids sur le marché, avec l'avantage supplémentaire de la réduction simultanée des déchets générés (**Jujjavarapu et Dhagat**, **2019**). De grandes quantités de déchets de cuisine sont produites dans la société moderne et leur élimination pose de graves problèmes environnementaux et sociaux (**Zhao et** *al.*, **2017**). Les déchets de cuisine sont le type le plus courant de déchets organiques anthropiques et comprennent de nombreux types de résidus alimentaires jetés. Une grande quantité de déchets d'épluchures de fruits et légumes est générée par la cuisine des ménages. Ses principaux composants chimiques sont l'amidon, les protéines, les graisses, la cellulose et autres (**Kwon et al., 2014**). De nombreuses recherches ont été menées sur le traitement des déchets alimentaires à l'aide de divers microorganismes, comme la fermentation aérobie et anaérobie (**Kiran et al., 2014 ; Tashyrev et al., 2022**). Parmi les différents microorganismes, les espèces du genre *Bacillus* sont largement considérées pour le traitement des déchets alimentaires (**An et al., 2018**). L'utilisation de ces déchets peu coûteux pour produire des produits à valeur ajoutée est une nouvelle étape dans leur utilisation durable (**Kumar et al., 2020**).

III.4.2.5. Effet des sources d'azote

L'effet des sources d'azote sur la production d'amylase chez les halophiles n'a pas été beaucoup étudié (**Kumar et al., 2016**). Les sources d'azote couramment utilisées comprennent la bactopeptone, le sulfate d'ammonium, le nitrate d'ammonium, la caséine, l'extrait de viande, l'extrait de bœuf, l'extrait de levure et la farine de soja. Aucune source d'azote ne peut donc être qualifiée d'universellement bonne. Les sources d'azote organiques aussi bien qu'inorganiques sont utilisées pour la production d' α -amylases, bien que les sources organiques aient été préférées aux sources d'azote inorganiques (**Sindhu et al., 2017**). À titre d'exemple, la production d'amylase par *Chromohalobacter* sp. TVSP101 était meilleure en présence de tryptone tandis que le chlorure d'ammonium et l'urée n'ont pas soutenu la production (**Prakash et al., 2009**).

III.4.2.6. Effet du sel et des ions métalliques

Le sel est vital pour la croissance des halophiles, donc dans la plupart des cas, la croissance ainsi que la production d'amylase diminuent en l'absence de sel. Le chlorure de sodium est le sel préféré pour la croissance et la production d'amylase. La concentration optimale de sel varie de 5-25% (p/v) pour une production maximale (**Kumar et al., 2016**). Les concentrations salines optimales pour la production d'amylases étaient de 10% (p/v) de NaCl et 20% (p/v) de NaCl ou 15% (p/v) de KCl pour *Bacillus* sp. souche TSCVKK (**Kiran et Chandra, 2008**) et *Chromohalobacter* sp.TVSP101 (**Prakash et al., 2009**), respectivement. Le sulfate de sodium et le chlorure de potassium sont suggérés comme substituts et meilleurs pour la production d'amylase par *Halobacillus* sp. souche MA-2 (**Amoozegar et al., 2003**) et *Bacillus dipsosauri* (**Deutch, 2002**), respectivement.

La supplémentation en ions métalliques dans le milieu de fermentation favorise la croissance microbienne, ce qui accélère la production d'enzymes. La plupart des α -amylases sont connues pour être dépendantes des métaux pour les ions divalents, par exemple Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ et Zn²⁺ (**Pandey et al., 2000**). Une supplémentation en Ca²⁺ est généralement requise pour une augmentation de la production d' α -amylase par plusieurs bactéries (**Sindhu et al., 2017**). La présence de 50 mM de chlorure de calcium (CaCl₂) a augmenté la production de 29% dans le cas de *Chromohalobacter* sp. TVSP101 (**Prakash et al., 2009**). Certains ions métalliques pourraient avoir un impact négatif sur la production d' α -amylase, à savoir le sulfate de cuivre (CuSO₄) dans le cas d'*Halobacillus* sp. souche MA-2 (**Amoozegar et al., 2003**).

III.5. Dosage des α-amylases

L'activité des α -amylases est quantifiée en mesurant soit les produits finaux, comme le glucose ou le maltose, soit la quantité de substrat qui reste après l'hydrolyse enzymatique. Les α -amylases sont dosées en utilisant l'amidon soluble ou l'amidon modifié comme substrat. La réaction est suivie par une augmentation des taux de sucres réducteurs ou une diminution de la couleur iodée du substrat traité. Différentes méthodes sont disponibles pour la détermination de l'activité d' α -amylase (**Sindhu et** *al.*, **2017**). Elles sont basées sur une diminution de l'intensité de la couleur iodée, une augmentation des sucres réducteurs, une dégradation du substrat complexé par la couleur et une diminution de la viscosité de la suspension d'amidon (**Gupta et** *al.*, **2003**). Les méthodes couramment employées pour la détermination de l'activité d' α -amylase sont: la méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS) (**Miller**, **1959**) ; la méthode de l'iode (**Hollo et Szeitli**, **1968**); l'activité dextrinisante (**Fuwa**, **1954**); la méthode de Sandstedt, Kneen et Blish (**Sandstedt et** *al.*, **1939**) ; et la dégradation du substrat complexé par la couleur (**Dhawale et** *al.*, **1982**).

La méthode de l'acide dinitrosalicylique (DNS) est l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour estimer les sucres réducteurs. Le DNS réagit avec le sucre réducteur sous ébullition et passe du jaune au rouge. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 540 nm. L'activité est calculée en soustrayant les valeurs A540 des blancs de substrat et d'enzyme de la valeur A540 de l'échantillon analysé (**Gusakov et** *al.*, **2011**).

III.6. Purification des α-amylases

Les α -amylases produites par fermentation sont des préparations relativement brutes. La plupart des utilisations commerciales de l' α -amylase ne nécessitent pas une purification à 100% de l'enzyme (**Sindhu et al., 2017**). Les amylases de haute pureté n'ont été utilisées que dans les secteurs pharmaceutique et clinique ainsi que pour l'étude des relations structure-fonction et des propriétés biochimiques des enzymes (**Gupta et al., 2003**). Il y a eu très peu d'études sur la purification et la caractérisation des amylases halophiles en raison de faibles quantités produites par les souches halophiles (**Kumar et al., 2016**).

Les premières étapes de la purification impliquent l'isolement de l'enzyme brute après la fermentation. Dans le cas de la fermentation submergée (SmF), cela se fait généralement en centrifugeant le milieu fermenté et en prenant le surnageant comme source d'enzyme brute ; dans le cas de la fermentation en milieu solide (SSF), la matière fermentée est généralement mélangée avec de l'eau ou des tampons, et après un mélange approprié, le contenu est filtré, le filtrat contenant l'enzyme brute est ensuite concentrée par ultrafiltration (Sindhu et al., 2017). La combinaison de la filtration et de la centrifugation est utilisée pour obtenir l'enzyme extracellulaire de la masse fermentée. L'amylase brute peut être précipitée et concentrée par précipitation au sulfate d'ammonium ou par des solvants organiques tels que l'éthanol à froid. L'échantillon précipité est soumis à une dialyse contre l'eau ou un tampon pour une (Shih concentration supplémentaire et Labbé, 1995). puis aux techniques chromatographiques telles que l'échange d'ions, la filtration sur gel et l'affinité. Le nombre d'étapes utilisées pour la purification des enzymes dépend du degré de pureté (Gangadharan et al., 2006 ; Sivaramakrishnan et al., 2007). Une combinaison de matrices chromatographiques a été utilisée en plusieurs étapes pour la purification des amylases halophiles. Les méthodes de purification utilisées suggèrent qu'il n'existe pas de protocole générique pour obtenir une amylase purifiée (Kumar et al., 2016). Dans certains cas, deux amylases ont été obtenues après purification. Par exemple, deux amylases extracellulaires halotolérantes ont été purifiées à partir de Chromohalobacter sp. TVSP 101 par ultrafiltration, précipitation à l'éthanol, chromatographie par interaction hydrophobe sur Butyl Sepharose 4B et chromatographie par exclusion sur Sephacryl S-200. Elles ont été désignées comme amylase I et amylase II (Prakash et al., 2009).

III.7. Caractérisation et propriétés spécifiques

Après la purification, on procède à la caractérisation des enzymes. La SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) est principalement utilisée pour la caractérisation de l'enzyme purifiée avec des marqueurs moléculaires comme l'albumine de sérum bovin (67 kDa) et l'ovalbumine (43 kDa). Le gel est ensuite coloré avec du bleu brillant de Coomassie ou du nitrate d'argent et visualisé (**Kumar et al., 2012**). Le poids moléculaire des α -amylases varie de 30 à 140 kDa. La plupart d'entre elles peuvent fonctionner correctement en présence de concentrations élevées de sel tandis que certaines sont actives dans une large gamme de températures et de valeurs de pH (**Amoozegar et al., 2019**).

III.7.1. Effet du pH et de la température

Les pH optimaux se situent pour la plupart des cas dans la gamme neutre et certaines d'entre elles ont montré une meilleure activité à pH alcalin. Quelques-unes d'entre elles ont montré une meilleure activité et stabilité à des températures plus élevées. Une amylase haloalcaline et thermostable avec une stabilité dans la gamme de température (30-90°C) et la gamme de pH (6-12) a été rapportée de *Thalassobacillus* sp. LY18, tandis que l'activité optimale était à pH 9 et 70°C (Li et Yu, 2012b).

III.7.2. Effet du sel et des ions métalliques

Le sel est un additif important, modulant l'activité et la stabilité des α -amylases halophiles. L'amylase extracellulaire de *Nesterenkonia* sp. souche F était active et stable dans une gamme de NaCl allant de 0 à 4 M avec un optimum enregistré à 0.5 M (**Shafiei et al., 2011**). Les α amylases sont des métallo-enzymes, bien connues pour contenir des ions calcium. Un comportement similaire a également été observé dans le cas des halophiles. Les ions mercure sont des inhibiteurs puissants pour cette classe d'amylase. **Li et Yu (2012b)** ont rapporté d'une part une augmentation de l'activité d'amylase produite par *Thalassobacillus* sp. LY18 en présence d'ions calcium et d'autre part son inhibition en présence des ions mercure.

III.7.3. Spécificité au substrat

Les α -amylases sont des enzymes endolytiques qui montrent une activité préférentielle sur l'amidon en catalysant l'hydrolyse des liaisons α -1,4-*O*-glycosidiques internes des polysaccharides en conservant la configuration α -anomérique des produits (**Sindhu et** *al.*, **2017**). Parmi les halophiles, le substrat privilégié est l'amidon bien qu'elles soient actives sur l'amylose, l'amylopectine et le glycogène. Ils n'utilisent pas la cyclodextrine et le pullulan

comme substrat. L'amylase de *Haloarcula hispanica* (Hutcheon et al., 2005), *Marinobacter* sp. EMB8 (Kumar et Khare, 2015) et *Halorubrum xinjiangense* (Moshfegh et al., 2013) était active sur l'amidon, l'amylose, l'amylopectine et le glycogène mais aucune activité n'a été détectée envers le pullulan et la β -cyclodextrine.

III.7.4. Stabilité en présence de solvants organiques

La stabilité aux solvants est de plus en plus reconnue comme un trait générique parmi les enzymes halophiles (**Gupta et Khare, 2009**). La présence d'un taux salin élevé réduit l'activité de l'eau de manière significative. Les enzymes halophiles sont donc particulièrement adaptées pour fonctionner dans des milieux à faible teneur en eau ou non aqueux (**Kumar et Khare, 2012**). Une stabilité significative aux solvants parmi les enzymes halophiles a été rapportée par différents groupes (**Shafiei et al., 2011 ; Li et Yu, 2012a,b ; Sinha et Khare, 2013a ; Pandey et al., 2018**).

III.7.5. Stabilité en présence d'agents tensioactifs

Les tensioactifs couramment utilisés sont le Tween 80, le Tween 40, le Triton X-100, le dodécylsulfate de sodium (SDS), le polyéthylène glycol, le β -Mercaptoéthanol, l'acide éthylènediamine tétra-acétique (EDTA), le fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) et le glycérol. Les amylases de *Bacillus* sp. souche TSCVKK et de *Nesterenkonia* sp. souche F ont conservé 90% de leur activité lors de l'incubation avec 0.1-0.5% de SDS et 0.1% de Triton X-100 et de Tween 80, respectivement (**Kiran et Chandra, 2008 ; Shafiei et** *al.*, **2010**).

III.8. Applications des α-amylases halophiles

Dans divers secteurs industriels, les méthodes chimiques utilisées pour l'hydrolyse ont été remplacées par des enzymes, ce qui rend le processus plus facile et plus écologique. L' α -amylase est l'une des enzymes industrielles les plus vendues. Les α -amylases mésophiles ont été largement utilisées dans divers secteurs comme l'alimentation, les détergents, le textile et les produits pharmaceutiques (**Pandey et al., 2000 ; Gurung et al., 2013**). Les amylases halophiles ont été moins explorées, même si elles offrent l'avantage de mieux fonctionner avec des échantillons salins, en raison de leur activité et de leur stabilité en présence de concentrations variables de sel. D'autres caractéristiques d'importance industrielle rencontrées dans cette classe d'amylases sont la stabilité dans des conditions de pH alcalin, de température élevée et de faible activité de l'eau (en présence de solvants organiques) (**Kumar et al., 2016**).

III.8.1. Liquéfaction et saccharification de l'amidon

L'une des principales applications des α -amylases a été la saccharification de l'amidon pour produire des malto-oligosaccharides (MOS) de différentes unités de glucose. Les MOS sont utilisés dans l'alimentation et les produits pharmaceutiques. Dans ce contexte, les amylases halophiles ont un bon potentiel pour une hydrolyse efficace de l'amidon et la génération de différents types de MOS (**Kumar et** *al.*, **2016**).

Dans un rapport sur l'immobilisation, l'amylase produite par *Marinobacter* sp. EMB8 immobilisée sur des nanoparticules de silice a démontré une meilleure hydrolyse de l'amidon par rapport à l'enzyme libre (**Kumar et Khare, 2015**). Outre l'hydrolyse des amidons solubles, la capacité d'hydrolyse de l'amidon brut a été démontrée par les amylases halophiles des bactéries *Nesterenkonia* sp. souche F (**Shafiei et al., 2011**) et *Amphibacillus* sp. souche NM-Ra2 (**Mesbah et Wiegel, 2014**). L'hydrolyse de l'amidon brut permet d'économiser de l'énergie car le processus de chauffage employé pour la solubilisation consomme beaucoup d'énergie.

La stabilité et l'activité à hautes températures, souhaitées pour la liquéfaction de l'amidon ont été observées chez de nombreuses amylases halophiles. L'amylase de *Rhodothermus marinus* peut être utilisée pour la production d'oligosaccharides ramifiés à haute température et salinité (**Yoon et al., 2008**). L'amylase active à froid de *Psychromonas antarcticus* et *Pseudoalteromonas haloplanktis* pourrait s'avérer bénéfique pour le traitement biologique de l'amidon à basse température (**Mountfort et al., 1998, Srimathi et al., 2007**).

III.8.2. Formulations des détergents

Dans l'industrie des détergents, les caractéristiques souhaitables des α -amylases sont plus complexes que dans d'autres industries, englobant la thermostabilité, la stabilité alcaline et la stabilité vis-à-vis de divers composants des détergents (agents oxydants et tensioactifs). Une α -amylase extracellulaire active à froid provenant de *Bacillus cereus* GA6 psychrohalotolérante a montré une capacité de résistance exceptionnelle aux dénaturants chimiques (urée, SDS et EDTA) et une compatibilité significative avec les détergents à lessive commerciaux, ce qui plaide en faveur de son aptitude à la formulation de détergents (**Roohi et** *al.*, **2013**). Une autre α -amylase halophile adaptée au froid (Amy175) produite par *Pseudoalteromonas* sp. M175 a été mise en évidence pour sa principale application dans l'industrie des détergents où elle a conservé plus de 76.9% de son activité amylolytique après une heure d'incubation à 25°C avec tous les détergents à lessive commerciaux testés (Wang et *al.*, 2018).

III.8.3. Clarification des jus de fruits

Les amylases sont utilisées dans la clarification des jus pour maximiser la production de jus clair (Sivaramakrishnan et *al.*, 2006). Le jus de pomme contient des quantités considérables d'amidon, en particulier au début de la saison de récolte. Les pommes non mûres contiennent jusqu'à 15% d'amidon et jusqu'à 1% dans le jus après extraction, broyage et pressage (Carrín et *al.*, 2004). L'amidon pose des problèmes lors du traitement du jus de pomme, car il complique la filtration et provoque un trouble après le traitement. L'amylase dégrade l'amidon en unités plus petites et contribue à prévenir la formation de trouble après la mise en bouteille. Par conséquent, l'amylase peut être utilisée pour améliorer le rendement et la clarification du jus de pomme (**Rana et** *al.***, 2017**).

Partie

expérimentale

Ce présent travail a été réalisé entre Avril 2013 et Décembre 2020 au niveau des laboratoires pédagogiques de contrôle de qualité et analyses et de microbiologie à l'Université Mohamed Seddik Benyahia de Jijel ; du département de biochimie et biologie moléculaire à l'Université de Séville, et au niveau du département de génétique, microbiologie et statistiques à l'Université de Barcelone, Espagne.

II.1. Préparation de l'anchois salé-mûr

Pour la réalisation de nos expériences, des échantillons d'anchois salés (*Engraulis encrasicolus*) préparés de manière artisanale ont été collectés du marché de poissons de la wilaya de Jijel (Nord-Est Algérien) et placés dans des boîtes en polystyrène à parois épaisses, emballés dans une glacière et livrés au laboratoire de traitement le jour même.

Cette méthode artisanale est une étape préliminaire du processus de salage humide, qui consiste à placer les anchois entiers dans des bacs et à les immerger dans une saumure saturée pendant 10 jours. Les anchois sont décapités, éviscérés et placés dans un tonneau de 25 kg de poids et 35 cm de hauteur en alternant les couches de poisson et de sel, avec un rapport final sel/poisson de 1:3 (kg). Enfin, le tonneau est fermé et des poids sont placés sur le couvercle pour presser le sel et les anchois. Après le pressage, ils sont laissés dans le tonneau pendant quatre mois à température ambiante, jusqu'à ce qu'ils aient développé une couleur rougeâtre et l'arôme souhaité (**Ayad et al., 2021**).

II.2. Echantillonnage

Pour obtenir une représentation fiable, trois échantillons de 1 kg d'anchois salés ont été choisis au hasard en trois exemplaires et prélevés de trois parties différentes (de haut en bas) du même tonneau (Ayad et *al.*, 2021):

Echantillon S : au sommet du tonneau (à 5 ± 2 cm).

Echantillon I : au milieu de la barrique (à 15 ± 2 cm).

Echantillon D : du fond de la barrique (à 30 ± 2 cm).

II.3. Détermination des paramètres physiques des anchois frais

Les caractéristiques physiques de la matière première (anchois frais) ont été déterminées en mesurant la longueur totale, le poids et le nombre de poissons par 1 kg de chaque échantillon (**Ayad et** *al.*, **2021**).

II.4. Évaluation sensorielle des anchois salés-mûrs

Une évaluation sensorielle de la progression de la maturation a été réalisée par un panel formé de six membres en utilisant le tableau proposé par Filsinger et *al.* (1982) dans lequel les

paramètres saveur, odeur, couleur de la chair, consistance de la chair et adhérence de la chair à l'arête sont évalués à l'aide d'une échelle de qualité en 8 points. Un score a été attribué à chaque attribut sur la base des descriptions figurant dans le tableau **4**. Le score du poisson a été déterminé en prenant la moyenne des cinq attributs. La valeur minimale de l'échelle de maturation est de zéro, ce qui représente les caractéristiques sensorielles du poisson cru juste avant le début du processus de maturation. Le point 6 correspond au niveau optimal de la maturation, tandis que le point 8 correspond à des anchois abîmés ou trop mûrs.

	0	2	4	6	8
Flaveur	poisson	neutre	ressemble	goût de	rance,
(négliger le	cru		légèrement	jambon,	mauvais
goût salé)			au jambon	- viande cuite-	goût
Couleur de la	naturelle du	naturelle aux	rose clair,	couleur rose	rouge
Chair	poisson	bords, rouge	rouge	uniforme	sombre,
	frais	foncé à	foncé		noire, tâches
		l'intérieur,	ou rose à		rouges et/ou
		rose	l'intérieur		points noirs
		au milieu			
Consistance	élasticité	moins	légère	plus	fragile, peu
de la chair	élevée,	élastique,	élasticité,	d'élasticité	résistante
	humide	moins	pas de	ferme et	
		humide	sensation	résistante à	
			humide	la pression du	
				doigt	
Odeur	chair	neutre (odeur	odeur	odeur agréable,	rance, acide,
	fraîche	de saumure)	agréable	caractéristique	ammoniacale
			des esters	du produit	ou sulfurée
			volatils	anchoité	
Adhérence	très	très	adhérente,	très peu	la chaire se
de la chair	adhérente,	adhérente,	se sépare	d'adhérence	déchire au
à la colonne	ne se sépare	ne se sépare	(filetage	filetage	moment du
vertébrale	pas	pas	incomplet)	adéquat	filetage
		facilement			

Tableau 4. Évaluation organoleptique de l'anchois salé-mûr (Filsinger et al., 1982).

II.5. Composition proximale et analyse physicochimique des anchois salés-mûrs

L'anchois salé a été analysé pour déterminer sa composition chimique proximale. Pour cela, tous les échantillons ont été analysés pour leur teneur en sel, en protéines, en graisses, en humidité, en matière sèche et en cendres selon les procédures analytiques standards de l'association des chimistes agricoles officiels (*Association of Official Agricultural Chemists*, AOAC). Les analyses ont été effectuées en trois exemplaires et les valeurs moyennes ont été calculées et exprimées en tant que moyenne \pm Ecart-type (SD : *Standard Deviation*) des observations.

II.5.1. Détermination du pH

Les échantillons de poisson salé (10 g) ont été homogénéisés avec 10 mL d'eau distillée pendant 5 min en utilisant un agitateur afin de former une bouillie épaisse. Le pH de la bouillie a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre Hanna Hi 2210 (Hanna Glass Works, Medfield, MA) (AOAC, 2000).

II.5.2. Détermination de l'acidité titrable totale (ATT)

Un poids de 25 g de l'anchois broyé est placé dans une fiole conique avec 50 mL d'eau distillée chaude récemment bouillie et refroidie. Ce mélange est agité jusqu'à obtention d'un liquide homogène. Un réfrigérant à reflux est adapté à la fiole conique, puis le contenu est porté à ébullition pendant 20 min. Après refroidissement, il est transvasé dans une fiole jaugée de 250 mL puis complété jusqu'au trait de jauge avec de l'eau distillée récemment bouillie et refroidie. Après filtration, 25 mL est prélevé et versé dans un bécher où quelques gouttes de phénolphtaléine sont ajoutées sous agitation constante, la titration est effectuée par une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH 0.1 M) jusqu'à apparition d'une couleur rose persistante pendant 30 secondes (AOAC, 1995).

L'acidité est déterminée par la formule suivante :

ATT (%) =
$$(250 \times V_1 \times 100 / m \times V \times 10) \times 1.99$$

Avec :

m : masse de la prise d'essai (g),

V : Volume du filtrat utilisé en titrage (mL),

V1: Volume consommé de la solution d'hydroxyde de sodium à 0.1 M (mL),

1.99 : Facteur de conversion de l'acidité titrable en équivalent d'acide oléique.

II.5.3. Détermination de la teneur en sel

Pour déterminer la teneur en sel de chaque échantillon, 2 g d'échantillon ont été homogénéisés avec 18 mL d'eau distillée. Après filtration du contenu à travers un papier-filtre plissé, une aliquote (1 mL) de filtrat clair a été transférée dans un flacon conique et ajoutée de 1 mL de solution de chromate de potassium (K_2CrO_4 10% (p/v)) comme indicateur. Le titrage

de l'aliquote est effectué sous agitation constante avec une solution de nitrate d'argent (AgNO₃ 0.1 M) jusqu'à l'apparition de la première couleur rouge-brun pâle perceptible. La couleur doit rester constante pendant 30 s. À la fin le volume de titrage a été enregistré. Il faut également effectuer un titrage à blanc des réactifs (AOAC, 1995).

La teneur en sel de l'échantillon est calculée en appliquant l'équation ci-après:

Teneur en NaCl (%) = V × M × F × 0.0585 × 100 / m

Avec:

V: Volume consommé d'AgNO₃ en titrage (mL),
M: Molarité d'AgNO₃ (mol/L),
F: Facteur d'AgNO₃,

m: masse de l'échantillon (g).

II.5.4. Détermination de la teneur en eau

Une quantité de 5g de chaque échantillon est mise dans une capsule préalablement tarée et séchée à 105 ± 1 °C pendant 8 h jusqu'à l'obtention d'un poids constant. La perte de poids au cours du processus est exprimée en pourcentage d'humidité dans l'échantillon (**AOAC**, **1990**).

La teneur en eau est exprimée selon la formule suivante :

$$H(\%) = (M-M_1)/m \times 100$$

Avec:

M : Masse en g de la prise d'essai avant séchage (g),

M1: Masse en g de la prise d'essai après séchage (g),

m : masse de l'échantillon (g).

II.5.5. Détermination de la teneur en matière sèche (MS)

2.5 g de chaque échantillon broyé est pesé dans un creuset en porcelaine préalablement taré. Il est ensuite mis à l'étuve à 105 ± 1 °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante (AOAC, 1996). Le pourcentage en matière sèche est déterminé par la relation suivante:

$$MS(\%) = m_{sec} / m_i \times 100$$

Avec :

m_i : masse de l'échantillon initial (g),

m_{sec} : masse de l'échantillon sec (g) après étuvage.

II.5.6. Détermination de la teneur en cendres

Des creusets d'incinération vides sont pesés. 5 g d'échantillon sont ajoutés et la masse de l'ensemble est notée. La fraction de cendres brutes a été obtenue en incinérant la matière organique à 550 °C dans un four à moufle pendant environ 5 h jusqu'à ce que l'échantillon soit exempt de particules de carbone. Après refroidissement dans un dessiccateur, les creusets contenant les cendres sont pesées à nouveau (AOAC, 1990).

La teneur en cendres des échantillons est calculée suivant la formule ci-après :

$C(\%) = (m_1 - m_2/m_1 - m_0) \times 100$

Avec :

m₀ : masse du creuset vide (g),

m1 : masse du creuset et les échantillons avant incinération (g),

m2 : masse du creuset avec les cendres (après incinération) (g).

II.5.7. Détermination de la teneur en matière grasse (MG)

La teneur en matière grasse a été mesurée par extraction au Soxhlet avec de l'éther de pétrole (AOAC, 1995).

L'échantillon résultant de la détermination du taux d'humidité a été transféré dans une cartouche Soxhlet. Cette dernière est placée dans l'appareil Soxhlet en l'ayant recouvert avec du coton sec. Le ballon qui servira à recouvrir le solvant a été pesé et a été y introduit de quelques billes en verre. Par la suite, un volume de 75 mL d'éther de pétrole est versé afin de dissoudre la matière grasse. La partie supérieure du tube d'extraction des graisses est fixée au condenseur. L'échantillon est extrait pendant 6 h ou plus sur un bain d'eau à 70 °C. Le solvant contenant la matière grasse a été retourné dans le ballon par déversements successifs causés par un effet de siphon dans le coude latéral. Le solvant s'évapore et la matière grasse s'accumule dans le ballon jusqu'à ce que l'extraction soit complète. Une fois l'extraction est terminée, la matière grasse est séchée à 100 °C pendant 1 h puis refroidie et pesée.

Le pourcentage de gras brut a ensuite été calculé comme suit:

$MG(\%) = (m/m_0) \times 100$

Avec :

m : masse de la matière grasse (g),m₀ : masse de l'échantillon (g).

II.5.8. Détermination de la teneur en protéines brutes (N)

La teneur en protéines brutes est déterminée par la méthode de Kjeldahl (AOAC, 1995). 1g de l'échantillon est minéralisé en milieu acide sulfurique pur (15 mL) en présence d'une pincée de catalyseur (sulfate de cuivre et de potassium). Par la suite, un chauffage progressif est appliqué où on assiste à une attaque à froid pendant 15 min jusqu'à l'apparition de vapeur blanchâtre d'anhydride sulfurique, suivi par un chauffage plus énergique consistant en une attaque à chaud pendant 4 à 5 h. La solution limpide obtenue, est ensuite refroidie et complétée à un volume de 100 mL avec de l'eau distillée. L'ammoniac (volatil) ainsi formé est entraîné par de la vapeur d'eau dans un distillateur semi-automatique (VELP), les vapeurs, condensées par réfrigération, sont recueillies dans un milieu suffisamment acide. Il est donc nécessaire d'introduire suffisamment de soude (20 mL de lessive de soude à 35%) pour neutraliser puis alcaliniser et transformer NH₄⁺ en NH₃. On peut vérifier que le milieu est bien alcalin en ajoutant quelques gouttes de phénolphtaléine à la soude. Le dégagement d'ammoniac est récupéré dans une solution d'acide borique à 25% contenant l'indicateur coloré (mélange de Tashiro de bleu de méthylène et rouge de méthyle). L'excès d'ammoniac est alors dosé par une solution d'acide sulfurique 0.05 M dans un titreur automatique et la teneur en protéines est calculée en multipliant le taux d'azote total N (%) par le coefficient 6.25.

La teneur en azote total est déterminée par la formule suivante :

$$N(\%) = (V/V') \times (V_1-V_0) \times 0.5 + 1.4 / m$$

Avec:

V: Volume de la solution minéralisée (mL),

V': Volume de la solution de soude ajoutée (mL),

V1:Volume d'acide sulfurique 0.05 M lue après titrage (mL),

 V_0 : Volume d'acide sulfurique consommé en titrage du témoin (mL),

m : masse de la prise d'essai (g).

II.5.9. Détermination de l'indice de peroxyde (Ip)

Pour réaliser ce test, 1 g d'échantillon broyé a été dissout dans 20 mL du mélange acide acétique-chloroforme (3/2) dans un Erlenmeyer de 250 mL, ensuite 1 mL d'une solution d'iodure de potassium (KI) a été ajouté. L'Erlenmeyer a été fermé hermétiquement et placé à l'obscurité pendant 5 min. Après, 75 mL d'eau distillée ont été ajoutés sous agitation. L'iode libéré est enfin titré par le thiosulfate de sodium (Na₂S₂O₃ 0.01 M) en présence d'empois d'amidon (**Annexe I**) comme indicateur. Un blanc est réalisé en parallèle dans les mêmes conditions (**AOAC**, 2000).

L'indice de peroxyde est exprimé en suivant l'équation suivante:

$$Ip (mEq/g) = (V_2 - V_1) \times 10/m$$

Avec :

 \mathbf{V}_2 : Volume de thiosulfate consommé par l'échantillon lors de la titration (mL),

 V_1 : Volume de thiosulfate consommé lors de la titration du blanc (mL),

m : masse de l'échantillon (g).

II.5.10. Détermination de l'indice de saponification (Is)

L'indice de saponification a été mesuré selon la méthode de la société des chimistes américains des huiles «*American Oil Chemists' Society*» (AOCS, 1993), où 1 g d'échantillon broyé a été dissous dans du KOH alcoolique 1 M et bouilli doucement dans un bain-marie pendant 30 min pour une saponification complète. La solution a ensuite été titrée avec de l'acide chlorhydrique (HCl 0.5 M) en utilisant de la phénolphtaléine comme indicateur. Parallèlement une réaction à blanc a été effectuée.

L'indice de saponification est donné par la formule suivante :

$$I_s (mg \ de \ KOH/g) = (V \ HCl \ témoin - V \ HCl \ essai) \times M \times 56.1 / m$$

Avec :

V_{HCl témoin}: Volume d'HCl titrant le blanc (mL),
V_{HCl essai}: Volume d'HCl titrant l'échantillon (mL),
M: Molarité d'acide chlorhydrique (mol/L),
m: masse de l'échantillon en (mg).

II.5.11. Détermination de l'indice d'acide (Ia)

Une prise d'essai de 10 g est dissoute dans un mélange constitué de 10 mL d'isobutanoléthanol et 10 mL de potasse alcoolique. 5 gouttes de la solution de phénol phtaléine sont ajoutées. La titration est faite sous agitation en versant goutte à goutte une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0.5 M) jusqu'à décoloration. Parallèlement, une réaction à blanc dans les mêmes conditions a été effectuée (**Perrier et al., 1997**).

L'indice d'acide est calculé comme suit :

$$I_a (mg \ de \ KOH/g) = (V \ _{HCl \ témoin} - V \ _{HCl \ essai}) \times M \times 56.1 \ / \ m$$

Avec :

VHCl témoin: Volume d'HCl titrant le blanc (mL),

V_{HCl essai}: Volume d'HCl titrant l'échantillon (mL),
M: Molarité d'acide chlorhydrique (mol/L),
m: masse de l'échantillon en (mg).

II.5.12. Détermination de la composition en acides gras

La composition en acides gras a été déterminée selon la norme NF EN ISO 12966-4: 2015, qui nécessite deux étapes préliminaires, l'extraction des acides gras et l'estérification : 20 g de chaque échantillon d'extrait lipidique obtenu précédemment par la méthode Soxhlet, ont été dissous dans 0.5 mL d'heptane. Par la suite, un volume de 0.2 mL de KOH méthanolique 2 M est ajouté. Le mélange est porté à ébullition dans un bain-marie pendant 2 min et ajouté de 0.2 mL de HCl 2 M. Après agitation vigoureuse et décantation, 100 µL de la phase supérieure ont été évaporés et le résidu a été reconstitué dans 50 µL d'heptane jusqu'à ce que la phase supérieure devienne claire, puis injecté dans un chromatographe en phase gazeuse. Les esters méthyliques d'acides gras ont été analysés par GC/MS sur un GC/MS Shimadzu QP2010 équipé d'une colonne capillaire SE30 (30 m \times 0.25 mm de diamètre interne, épaisseur de film de 0.25 µm) et d'hélium comme gaz porteur à un débit de 0.76 mL/min. L'injection des échantillons a été réalisée en mode fractionné. La colonne a été maintenue à 140 °C pendant 10 min, puis programmée pour augmenter de 1 °C/min jusqu'à 160 °C, puis de 2 °C/min jusqu'à 220 °C et enfin maintenue pendant 15 min. En examinant l'ordre de l'élution sur la colonne et en comparant les temps de rétention à ceux des étalons purs, les pics du chromatogramme ont été identifiés comme étant des esters méthyliques d'acides gras correspondants.

II.5.13. Détermination de la teneur en matière minérale et éléments traces métalliques

Afin de déterminer la teneur en éléments minéraux, une solution de cendres de chaque échantillon (10 mL) a été hydrolysée avec 1 mL d'HCl puis portée à ébullition jusqu'à dissolution complète des cendres. La solution obtenue a été ensuite transférée dans une fiole jaugée de 100 mL dont le volume est complété à 100 mL par l'ajout de l'eau distillée (**NF V04-404: 2001**). À partir de cette solution finale, les teneurs en plomb (Pb), fer (Fe), chrome (Cr), manganèse (Mn), cuivre (Cu), zinc (Zn) et cadmium (Cd) ont été analysées par spectrométrie d'absorption atomique (Shimadzu AA-6200).

II.6. Analyse microbiologique

II.6.1. Préparation de la solution mère et des dilutions décimales

La chair des anchois salés-mûrs a été hachée et broyée pendant 1 min à l'aide d'un mélangeur commercial Waring (USA). Chaque échantillon (10 g) a été prélevé aseptiquement et

homogénéisé mécaniquement dans 90 mL de bouillon salé stérile [extrait de viande (3 g/L) ; peptone de viande (5 g/L) ; NaCl (150 g/L)] (**ICMSF, 1983**). Comme étape d'enrichissement, l'homogénat a été incubé à 37 °C pendant 30 min pour récupérer les cellules vivantes stressées. Ensuite, des dilutions décimales 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} ont été préparées à partir de la solution mère et étalées dans les milieux de croissance. Le dénombrement des microorganismes a été effectué en double et la valeur moyenne de chaque comptage a été exprimée en nombre d'unités formant des colonies/g (UFC/g) suivant la formule donnée ci-dessous :

$$\mathbf{N} = \boldsymbol{\Sigma} \mathbf{C} / (\mathbf{N}_1 + \mathbf{0.1}\mathbf{N}_2) \times \mathbf{FD}$$

Avec :

 Σ C : Somme des colonies comptées sur toutes les boites retenues,

 N_1 : Nombre des boites retenues dans la $1^{\check{e}re}$ dilution,

 N_2 : Nombre des boites retenues dans la $2^{\grave{e}me}$ dilution,

 \mathbf{FD} : Facteur de dilution correspondant à la 1^{ère} dilution.

II.6.2. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)

Le dénombrement de la FTAM est effectué sur gélose PCA (*Plate Count Agar*) en ensemençant 1 mL des dilutions 10^{-4} et 10^{-5} et en incubant à 30° C pendant 48 h. Les boites contenant 30 à 300 colonies ont été retenues (**AOAC**, **1995**).

II.6.3. Dénombrement des coliformes totaux et des coliformes thermo-tolérants

La gélose VRBL (*Violet, Red Bile Lactose agar*) préalablement fondue et refroidie est ensemencée par 1mL des dilutions 10⁻¹ et 10⁻² puis les boites sont incubées à 37°C pendant 24 h. Après incubation, les boites contenant entre 15 et 150 colonies rouges et ayant au moins 0.5 mm de diamètre sont retenues pour la lecture (**NF ISO 4832: 2006**).

Le dénombrement des coliformes thermo-tolérants est effectué selon la même technique du dénombrement des coliformes totaux en milieu solide VRBL mais avec une incubation à 44°C (**NF ISO 4832 : 2006**).

II.6.4. Dénombrement des bactéries lactiques

Le dénombrement est effectué par étalement de 1 mL des dilutions10⁻³ et 10⁻⁴ en surface de la gélose MRS (*Man Rogosa-Sharpe agar*). L'incubation est faite à 37°C pendant 24-48 h. Les colonies à dénombrer sont de petites tailles, de couleur blanchâtre et brillante, et à pourtour régulier. Elles peuvent apparaître en forme circulaire ou lenticulaire (**Larpent, 1997**).

II.6.5. Recherche et dénombrement des Clostridium-sulfito-réducteurs

La recherche des *Clostridum-sulfito-réducteurs* est effectuée dans un tube contenant la gélose Viande-Foie (VF) avec additifs Alun de fer et sulfite de sodium. Le milieu de culture est ensemencé après destruction des formes végétatives, en passant l'échantillon au bain-Marie à 80 ± 2 °C pendant 10 min et en le refroidissant à 45 °C. L'incubation est réalisée à 46°C \pm 1°C pendant 24-48 h (**ISO 15213: 2003**).

II.6.6. Recherche et dénombrement de Staphylococcus aureus

L'ensemencement est effectué par étalement de 0.1 mL de la solution mère sur gélose *Baird-Parker* préalablement fondue et refroidie. Les colonies caractéristiques de *Staphylococcus aureus* sont noires, brillantes et convexes (1 à 1.5 mm de diamètre après 24 h d'incubation à 37°C et 1.5 à 2.5 mm de diamètre après 48 h d'incubation) et entourées d'une zone claire qui peut être partiellement opaque. Après 24 h d'incubation, il peut apparaître dans cette zone claire un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies (**Guiraud, 2003**).

II.6.7. Dénombrement des levures et moisissures

L'ensemencement est effectué par étalement de 0.1 mL de la dilution 10⁻¹ sur gélose OGA (*Oxytetracycline Glucose Agar*) préalablement fondue et refroidie. L'incubation est faite à 25°C pendant 5 jours (**Larpent, 1997**). Les moisissures présentent un aspect cotonneux et filamenteux alors que les levures se présentant sous forme de colonies pigmentées, rondes plus au moins bombés ou plates.

II.6.8. Dénombrement de la flore halophile

Le nombre de bactéries halophiles a été déterminé en utilisant le milieu halophile (HM : *Halophilic Medium*) de **Torreblanca et al. (1986**) contenant (par litre d'eau distillée): 5 g peptone, 5 g extrait de levure, 22 g agar à deux concentrations finales de sel total de 5% et 10% (p/v) (**Annexe I**). La solution mère ou le stock de sels totaux à 30% (p/v) a été préparée comme décrit par **Subov (1931)**: (NaCl, 234 g; MgCl₂.6H₂O, 42 g; MgSO₄.7H₂O, 60 g; KCl, 6 g; CaCl₂.2H₂O, 1 g; NaBr, 0.7 g; NaHCO₃, 0.2 g; FeCl₃, 0.005 g). Le pH du milieu est ajusté à 7.2 à l'aide d'une solution de NaOH 4 M.

0.1 mL de la solution mère ou de ses dilutions (10⁻¹ et 10⁻²) est étalé sur le milieu solide, ensuite les boites de Pétri sont incubées à 37°C jusqu'à apparition de colonies. Les colonies à différents aspects macroscopiques sont sélectionnées, purifiées par repiquage successifs sur le même milieu d'isolement. Elles sont ensuite conservées à -80°C dans 20% de glycérol (**Tindall, 1992**).

II.7. Caractérisation des isolats halophiles

Le choix des isolats soumis à une caractérisation morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire détaillée est basé sur leur production concomitante de plusieurs hydrolases extracellulaires en particulier celle des enzymes dégradant les glucides complexes (amylase, cellulase et pectinase).

II.7.1. Screening des activités hydrolytiques extracellulaires

La production d'hydrolases extracellulaires est recherchée qualitativement sur milieu solide de **Torreblanca et** *al.* (**1986**) (**II.6.8**) modifié par réduction de la quantité d'extrait de levure et de peptone à 2.5 g/L (milieu de base) et par rajout de polymère-test (**Oren et** *al.*, **1997**).

II.7.1.1. Mise en évidence de l'activité amylolytique

La présence de l'activité amylolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par **Amoozegar et** *al.* (2003), en utilisant le milieu de base additionné de 1% (p/v) d'amidon soluble. Après incubation, les colonies sont inondées avec une solution de Lugol (0.3% I₂, 3% KI). L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour de la colonie. À l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

II.7.1.2. Mise en évidence de l'activité cellulolytique (CMCase)

La présence d'une cellulase est examinée sur milieu de base contenant 0.5% (p/v) de Carboxy Méthyl Cellulose (CMC). Après incubation, les boites sont pulvérisées avec une solution au Rouge Congo à 0.1% (p/v) et incubées à 30°C pendant 15 à 30 min. Cette solution est remplacée par une solution de NaCl (1M) durant 5 à 10 min et laissée à température ambiante. L'apparition de zones claires autour des colonies est un résultat positif indiquant la présence de cellulase (**Mwirichia et al., 2010**).

II.7.1.3. Mise en évidence de l'activité pectinolytique

La présence de l'activité pectinolytique est déterminée qualitativement selon la méthode décrite par **Soares et al. (1999)**, en utilisant le milieu de base additionné de 1% (p/v) de pectine soluble. Après incubation, les colonies sont inondées avec une solution de Lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par apparition d'une zone claire autour de la colonie. À l'inverse, les zones contenant de la pectine se colorent en brun clair.

II.7.1.4. Mise en évidence de l'activité xylanolytique

L'activité xylanolytique est recherchée sur milieu de base supplémenté de 1% (p/v) de xylane. L'ensemencement a été fait par une strie centrale. Après incubation à 37°C pendant 24-48 h, les boites de Pétri sont inondées par une solution de Rouge Congo à 0.1% (p/v) pendant 15 à 30 min, puis sont traitées par une solution de NaCl à 1M pendant 5 à 10 min à température ambiante. La production de xylanase est mise en évidence par l'apparition de zones claires autour des colonies (**Bragger et** *al.*, **1989**).

II.7.1.5. Mise en évidence de l'activité protéolytique

Ce test vise la recherche des enzymes suivantes :

Recherche de la caséinase : Le milieu de base est supplémenté par 1% (p/v) de caséine. Après ensemencement, les boites de Pétri sont incubées. La présence de cette activité est détectée par un halo clair autour des colonies indiquant une hydrolyse de la caséine (**Cojoc et** *al.*, **2009**).

Recherche de la gélatinase : La production de gélatinase est mise en évidence en ensemençant par piqure les tubes contenant le milieu de base supplémenté par 3% de gélatine. Après incubation, les tubes sont placés au réfrigérateur à 4°C pendant 30 min. La liquéfaction du milieu indique la formation de gélatinase (**Betty et al., 2007**).

II.7.1.6. Mise en évidence de l'activité lipolytique

Les enzymes suivantes ont été recherchées :

Recherche de l'estérase : La recherche d'estérase est effectuée par le test d'hydrolyse des Tweens 20 et 80 en ensemençant par touche le milieu de base contenant 1% (v/v) de l'un des Tweens. Après incubation, le développement d'un précipité autour des touches témoigne la présence d'une estérase (**Gonzalez et al., 1978**).

Recherche de lipase : Cette activité est recherchée sur milieu à base d'huile d'olive (2.5% (v/v). L'ensemencement des souches est effectué par touches. Après incubation, la présence d'une lipase se traduit par l'apparition d'un précipité autour des touches (**Sigurgísladóttir et** *al.*, **1993**).

II.7.2. Caractérisation morphologique des isolats et de leurs colonies

Tous les tests phénotypiques utilisés dans ce travail sont recommandés par le *Bergey'sManual* of Systematic Bacteriology (Logan et De Vos, 2015), et sont proposés parmi les standards minimums pour la description de bactéries formant-endospores (Logan et al., 2009).

II.7.2.1. Caractérisation macroscopique

La morphologie des colonies est déterminée à l'œil nu sur milieu solide HM décrit précédemment en **II.6.8**. L'observation de leur aspect macroscopique permet d'effectuer une

première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification. Les éléments d'identification macroscopiques sont : la forme des colonies ; la taille des colonies par la mesure du diamètre ; la pigmentation ; l'élévation ; l'opacité et la surface.

II.7.2.2. Caractérisation microscopique

II.7.2.2.1. Coloration de Gram

La forme et l'arrangement cellulaires sont déterminés par la coloration de Gram modifiée par **Dussault (1955)** par application, après fixation, d'une solution d'acétate à 2% (v/v) pendant 5 min. L'observation est effectuée à immersion à un grossissement \times 100 à l'aide d'un microscope photonique Olympus CX31 équipé d'un appareil photo numérique U-CMAD3.

II.7.2.2.2. Coloration des spores au vert de malachite

La position de la spore, sa forme, ainsi que la déformation qu'elle peut engendrer sont déterminés en utilisant la méthode de **Schaeffer et Fulton (1933)**. Après avoir fixé les cellules, le frottis est recouvert d'un carré de papier buvard et saturé de la solution de coloration vert malachite pendant 5 minutes en passant la lame à la flamme de Bec-Bunsen et en ajoutant plus de colorant lorsqu'il séchait. Par la suite la lame est lavée avec de l'eau distillée et les spécimens sont contre-colorés avec de la safranine pendant 30 s, puis lavés une autre fois avec de l'eau distillée. Les lames sont examinées à immersion à un agrandissement $\times 100$. Les cellules végétatives apparaissent de couleur rouge à rose, tandis que les endospores se colorent en vert vif.

II.7.3. Caractérisation physiologique des isolats

L'influence sur la croissance de la salinité, de la température et du pH est déterminée sur milieu HM liquide à 600 nm en variant un des paramètres alors que les deux autres sont maintenus constants.

Pour l'effet de la salinité : La croissance aux différentes concentrations finales de sel (0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 25% ou 30%, p/v) est examinée à une température de 37°C, un pH de 7.2 ± 2 et une agitation à 150 rpm.

Pour l'effet de la température : Les milieux de culture sont préparés en respectant la concentration saline finale optimale de chaque isolat. Le pH est ajusté à 7.2 ± 2 . Après ensemencement, l'incubation a eu lieu à 20 ; 30; 37; 40; 45; 50; 55 et 60°C sous une agitation à 150 rpm.

Pour l'effet du pH : Le pH optimal de croissance est déterminé dans les conditions optimales de température et de salinité de chaque isolat en ensemençant les milieux de culture aux différents pH 5, 6, 7, 8, 9, 10 et 11, en utilisant les solutions tampons : acétate pH 5, phosphate pH 6-8 et glycine-NaOH pH 9-11(**Tableaux 5-7-Annexe I**).

II.7.4. Caractérisation biochimique des isolats halophiles

Le profil biochimique des souches désignées comme intéressantes est assuré par une série de tests biochimiques. Chaque test est réalisé en double et en présence d'un témoin négatif en cas de nécessité. L'incubation s'est faite à la température optimale de chaque souche pendant 24-48 h. La composition des milieux et des réactifs utilisés pour la galerie biochimique est rapportée en **tableau 8-annexe I**. La galerie biochimique inclut :

II.7.4.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires

II.7.4.1.1. Cytochrome-oxydase

La recherche de la cytochrome-oxydase est effectuée à l'aide de disques « Ox » dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N,N-diméthyl-1,4-phénylène diamine-dichlorure. Une colonie est prélevée à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur et dissociée sur le papier filtre imbibé d'eau distillée. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 s, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé (**Gerhardt et** *al.*, **1994**).

II.7.4.1.2. Catalase

La présence de la catalase est mise en évidence en dissociant à l'aide de l'effilure d'une pipette Pasteur une quantité suffisante de la culture sur une lame de verre contenant une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes. La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène (**Gerhardt et** *al.*, **1994**).

II.7.4.2. Recherche de la β-galactosidase

Des suspensions denses de culture sont préparées dans des solutions salines optimales correspondantes à chaque souche puis un disque imprégné d'Ortho-Nitro-Phényl- β -Galactoside (ONPG) est ajouté à chaque suspension. Après incubation pendant 18 à 24 h, l'apparition d'une coloration jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et en conséquence la présence de la β -galactosidase (**Joffin et Leyral, 2006**).

II.7.4.3. Recherche de la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH)

Ces enzymes, dont l'action est favorisée en milieu acide, forment des substances alcalines à partir des acides aminés.

Les milieux utilisés ne contiennent qu'un seul acide aminé, lysine, ornithine ou arginine. Quatre tubes contenant le bouillon de Moeller dont un est un témoin sont inoculés avec une suspension microbienne. Après incubation, une réaction négative se traduit par une coloration jaune (acidification du milieu) alors que l'apparition d'une coloration violette (alcalinisation du milieu) révèle une réaction positive (**Guiraud, 1998**).

II.7.4.4. Recherche de l'uréase

L'enzyme hydrolysant l'urée est recherchée sur le milieu synthétique à l'urée de Christensen. Les souches sont ensemencées sur gélose inclinée puis incubées. La réaction positive se traduit par une coloration rouge violacée ou orange foncée par contre une teinte jaune du milieu indique une réaction négative (**Guiraud**, **1998**).

II.7.4.5. Recherche du nitrate réductase

Ce test consiste à mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme nitrate réductase. Les souches sont cultivées sur bouillon nitraté, après incubation à 30°C pendant 48 h, trois gouttes de chacun des réactif NIT I et NIT II, appelés aussi réactifs de GRIESS, sont ajoutées à la culture (**De Vos et** *al.*, **2009**).

La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En absence de cette coloration, quelques milligrammes de la poudre de zinc sont additionnés s'il y a :

- Apparition de la coloration rouge: les nitrates sont encore présents dans le milieu et sont réduits en nitrites par le zinc, donc la souche ne possède pas la nitrate réductase.
- Absence de coloration rouge : les nitrates sont réduits par les bactéries jusqu'au stade azote, donc la souche possède la nitrate réductase.

II.7.4.6. Production d'indole

L'ensemencement des souches est réalisé sur un milieu de culture liquide supplémenté de 0.5% (p/v) d'extrait de levure. Après incubation, la production d'indole est mise en évidence par l'ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge à la surface (**Gonzalez et** *al.*, **1978**).

II.7.4.7. Croissance sur le milieu Triple Sugar Iron (TSI)

En utilisant un fil de platine, le culot de la gélose est ensemencé par une piqure centrale jusqu'à une profondeur de 3 à 5 mm du fond du tube, une fois le fil est retiré, la pente est ensemencé par stries. L'utilisation de l'un des sucres présents dans le milieu de culture se traduit par une acidification révélée par un jaunissement du culot dans le cas de glucose et de la pente dans le cas du lactose et/ou du saccharose. La production de sulfure d'hydrogène à partir du thiosulfate est mise en évidence par la formation d'une coloration noire et le dégagement de CO_2 est révélé par l'apparition de bulles d'air dans le culot ou le décollement de la gélose (**Guiraud, 1998**).

II.7.4.8. Croissance sur le milieu mannitol-mobilité

La mobilité bactérienne ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées en ensemençant le milieu semi-solide mannitol-mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. La mobilité est révélée par un envahissement plus ou moins important du milieu à partir de la piqure d'inoculation alors que l'utilisation du mannitol est traduite par un virage de la couleur du rouge au jaune (**Gerhardt et** *al.*, **1994**).

II.7.4.9. Utilisation du citrate sur le milieu au citrate de Simmons

La capacité des souches à assimiler le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est testée sur un milieu synthétique au citrate de Simmons en ensemençant la pente du milieu en stries longitudinales. Après incubation, la croissance sur ce milieu s'accompagne généralement d'une alcalinisation provoquant le virage de couleur du vert au bleu vif (**Harley et Prescott, 2002**).

II.7.4.10. Réactions de Voges Proskauer (VP) et au Rouge de Méthyle (RM)

La présence d'acétoïne est mise en évidence en ensemençant le milieu de Clark et Lubs et après incubation, en ajoutant 0.5 mL de KOH à 40% (p/v) (réactif VP1) et 0.5 mL d' α -naphtol (p/v) (réactif VP2). Une réaction positive (VP+) se révèle par une coloration rose. La production d'acides mixtes est recherchée sur le même milieu. La lecture se fait par

addition de quelques gouttes d'une solution au rouge méthyle. Une réaction positive (RM+) se traduit par le virage de la couleur du bouillon au rouge (**Harley et Prescott, 2002**).

II.7.4.11. Tests sur Galerie API[®]20ETM

Le panel biochimique des tests API[®]20 ETM BioMérieux (2010) a été utilisé pour compléter les tests de la galerie biochimique et de confirmer en même temps les résultats de tests déjà réalisés en utilisant les milieux préparés. Cette galerie permet de mettre en évidence en plus :

- Le métabolisme de certains sucres, sucre-alcools et hétéroside cyanogène (D-glucose, D-saccharose, D-melibiose, L-rhamnose, L-arabinose, D-mannitol, inositol, Dsorbitol, amygdaline),
- et la présence d'enzymes spécifiques (tryptophane désaminase, gélatinase).

La galerie miniaturisée API[®]20 ETM comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Une suspension bactérienne est utilisée pour réhydrater chacun des puits et les bandelettes sont incubées à 37°C pendant 24 h. Pendant l'incubation, le métabolisme bactérien produit des changements de couleur qui sont soit spontanés, soit révélés par l'ajout de réactifs. L'interprétation se fait selon un tableau de lecture (**Tableau 9-Annexe III**).

II.7.5. Caractérisation moléculaire des isolats performants

II.7.5.1. Extraction de l'ADN génomique

Une culture de la souche sélectionnée en phase exponentielle a été préparée dans 20 mL du bouillon LB à concentration saline finale de 5%. Les cellules bactériennes ont été récupérées dans un tube de micro-centrifugation à 4°C pendant 10 min à 5000 ×g (microcentrifugeuse Eppendorf 5415 D), et l'ADN génomique a été extrait en utilisant un kit de purification (Thermo ScientificTMGene JET Genomic DNA Purification Kit) en suivant les instructions du fabricant selon un protocole adapté aux bactéries à Gram positif. Après avoir éliminé le surnageant, le culot a été re-suspendu dans180 µL d'un tampon de lyse (20 mM Tris-HCl, pH 8; 2 mM EDTA; 1.2% Triton X-100; lysozyme (20 mg/mL)), et incubé à 37°C pendant 30min. Après incubation, la solution a été traitée par 200 µL d'une solution de lyse additionnée de 20 µL de la protéinase K et mélangée soigneusement par vortex afin d'obtenir une solution homogène. Le tout a été placé dans un thermo-mixeur à 56°C pendant 30 min. 20 µL de la solution RNase ont été ajoutés, mélangés par vortex et le mélange a été incubé à température ambiante durant 10 min. Après incubation, l'ajout de 400 µL d'éthanol 50% suivi d'une agitation par vortex a été réalisé dans le but de précipiter l'ADN génomique. Le lysat préparé a été transféré dans une colonne de purification d'ADN génomique GeneJET insérée dans un tube collecteur (*Mini Spin Column*) suivi d'une centrifugation à $6000 \times g/1$ min. Après avoir jeté le tube collecteur contenant la solution d'écoulement, la colonne a été placée dans un nouveau tube collecteur de 2 mL. Deux étapes de lavage sont recommandées afin d'éliminer le maximum de débris cellulaires et impuretés en utilisant deux tampons de lavage à base d'éthanol (WB I et WB II) afin d'éliminer toute trace de sel, suivi d'une double centrifugation, la première à $8000 \times \text{g}/1$ min et la deuxième à une vitesse maximum de $14000 \times \text{g}/3$ min, respectivement. Après avoir jeté le tube de collecte contenant la solution d'écoulement, la

colonne de purification de l'ADN génomique GeneJET a été transférée dans un eppendorf stérile de 1.5 mL. L'ADN génomique a été récupéré en ajoutant 200 μ L de tampon d'élution au centre de la membrane de la colonne de purification. L'eppendorf a ensuite été incubé à température ambiante pendant 2 min et centrifugé à 8000 × g pendant 1 min. Après avoir jeté la colonne de purification, l'ADN purifié a été récupéré et utilisé immédiatement pour mesurer sa concentration et sa pureté puis conservé à - 20°C jusqu'à manipulation.

II.7.5.2. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN

La concentration et la pureté de l'ADN ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre ND-100 NanoDrop® (Thermo Scientific) (1 μ L de dépôt). La pureté de l'ADN est évaluée en mesurant les absorbances à 230, 260 et 280 et en calculant les rapports A260/A280 et A260/A230. Le rapport A260/A280 doit être compris entre 1.8 et 2. Une valeur inférieure à 1.8 révèle une contamination protéique ou phénolique alors qu'une valeur supérieure à 2 indique une présence significative d'ARN. Le deuxième rapport A260/A230 doit se situer entre 2 et 2.2. Lorsqu'il est plus faible cela indique la présence de contaminants comme le phénol, l'EDTA, guanidine, HCl, etc. (**Wilfinger et** *al.***, 1997**).

II.7.5.3. Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

L'ADN génomique extrait a été directement amplifié en utilisant les amorces spécifiques FW27F (*Forward*) (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et BW1525R (*Reverse*) (5'AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). L'amplification PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 50 μ L contenant 5 μ L d'ADN purifié, 36 μ L d'eau Milli-Q, 5 μ L de tampon de réaction standard 10X avec MgCl₂ (10 mM), 1 μ L de mélange dNTP (10 mM), 1 μ L d'amorce directe (10 μ M), 1 μ L d'amorce inverse (10 μ M) et 1 μ L de la TaqADN polymérase (5U/ μ L). L'amplification PCR est réalisée avec un thermo-cycleur T100TM (Bio-RadTM, CA, USA). Le profil de température PCR utilisé était de 94°C pendant 3 min suivi de 30 cycles consistant en 94°C pendant 30 s, 55°C pendant 30 s, 72°C pendant 100 s, avec une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 min. Les produits de la PCR sont ensuite visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose puis conservés à -20°C avant d'être envoyés au service de séquençage.

II.7.5.4. Electrophorèse sur gel d'agarose

L'efficacité et la qualité de la réaction de polymérisation par PCR ont été vérifiées au moyen de l'électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0.8% (p/v) coloré avec 0.05 μ L/mL de colorant premium *GreenSafe* (NZYtech) en utilisant le tampon ROTIPHORESE®TAE 1X préparé à partir de la dilution d'une solution mère ROTIPHORESE® TAE 50X (2 M Tris, M
acide acétique, 50 mM EDTA, pH 8.5). L'électrophorèse a été réalisée à 100 V/400 W pendant 40 min. La présence du colorant premium *GreenSafe* (NZYtech) permet de visualiser les bandes de migration d'ADN par fluorescence sous *UV*. Le marqueur de poids moléculaire *GeneRuler*TM *1 kb DNA Ladder* (10000 à 250 pb) a été utilisé pour confirmer la taille approximative des produits amplifiés. Le gel est visualisé et photographié sous un transilluminateur à lumière ultraviolette en utilisant un système d'imagerie Gel DocTM XR+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

II.7.5.5. Séquençage des produits d'amplification

Les fragments amplifiés par PCR ont été séquencés au service MACROGEN Advancing through Genomics (Madrid, Espagne). À partir de ces résultats, le positionnement phylogénétique des souches est réalisé. La recherche d'homologie du gène d'ADNr 16S a été réalisée par BLAST en utilisant la base de données GenBank de NCBI «*National Center for Biotechnology Information* https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi» (**Benson et al., 1999**).

II.8. Sélection de la souche la plus performante

La souche la plus performante codée AC12 (*Bacillus flexus*) a été choisie sur la base de sa capacité à produire une amylase extracellulaire sur gélose à base d'amidon. La zone d'hydrolyse a été observée et l'indice enzymatique a été calculé comme suit (**Rehman, 2019**):

Indice Enzymatique (IE) = Diamètre de la zone d'hydrolyse / Diamètre de la colonie. Afin de maximiser la production de cette enzyme, une optimisation des conditions de culture est réalisée sur bouillon LB, Miller (*Luria-Bertani*) fourni sous forme déshydratée.

II.9. Production d'amylase par Bacillus flexus AC12

1% d'une culture pré-inoculée sur bouillon LB pendant une nuit ($DO_{600 nm} = 0.78$ avec une densité cellulaire ~ 1×10^7 UFC/mL) est utilisé comme inoculum dans 50 mL de milieu basal (1) incorporé de 1% d'amidon soluble transféré dans un Erlenmeyer de 250 mL. La croissance des cellules est effectuée à 37 °C pendant 48 h dans un incubateur-agitateur (Lan Technics HWY-200D) à 150 rpm. Après incubation, la culture est soumise à une centrifugation (Eppendorf Centrifuge 5804 R) à 10000 × g pendant 15 min à 4 °C. Le surnageant est utilisé comme source d'enzyme brute pour le dosage de l'activité amylasique en utilisant de l'amidon soluble comme substrat (**Dash et** *al.*, **2015**).

II.9.1. Mesure de l'activité amylasique

L'activité amylasique est mesurée à l'aide d'un mélange réactionnel contenant 33 μ L d'amidon soluble 1% (p/v) comme substrat dissous dans de l'eau Milli-Q, 33 μ L d'un tampon

phosphate de sodium 150 mM (pH 7.2) et 33 μ L de surnageant. Après incubation à 37 °C pendant 10 min, la réaction est arrêtée en ajoutant 100 μ L de réactif d'acide 3,5dinitrosalicylique (DNS). Après avoir bouilli au bain-Marie pendant 5 min, le mélange est refroidi dans la glace pendant 5 min. Par la suite un volume de 40 μ L du mélange réactionnel est additionné de 260 μ L de l'eau Milli-Q. L'absorbance à 540 nm est lue avec un lecteur de microplaques de 96 puits (Biochrom Asys UVM340) comme décrit par **Miller (1959)**, en se référant à une courbe d'étalonnage de glucose (**Figure 4-Annexe II**). Une unité d'activité amylasique est définie comme la quantité d'enzyme qui libère 1 μ mol de sucre réducteur (glucose) par minute dans les conditions d'essai (**Suganthi et** *al.*, **2015**). L'activité enzymatique est calculée en utilisant la formule suivante :

Activité amylasique (UI/mL/min) = $(Q_{glu} \times V \times FD) / (PM_{glu} \times VE \times T)$

Avec :

Qglu : Quantité de glucose libérée (μg), V : Volume total du milieu réactionnel (mL), FD : Facteur de dilution, PM glu: Poids moléculaire du glucose (g/mol), VE : Volume d'enzyme utilisé (mL),

T : Temps d'incubation (min).

II.9.2. Estimation du taux des protéines

La teneur en protéines est estimée par la méthode de Bradford (**Bradford, 1976**) en utilisant l'albumine de sérum bovin (*BSA, Bovine Serum Albumin*) comme standard. 150 μ L du réactif de Bradford est ajouté à 150 μ L de l'échantillon à doser. Le mélange est laissé pendant 5 min à température ambiante et l'absorbance est lue à 595 nm dans un lecteur de microplaques de 96 puits (Biochrom Asys UVM340). La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée par interpolation à partir d'une courbe standard réalisée en mesurant l'absorbance d'une série de dilutions de BSA (*Bovine Serum Albumin*) de concentrations connues allant de 0 à 100 μ g/ μ L (**Figure 5-Annexe II**). La solution de réactif est ajoutée en même temps dans tous les tubes à l'aide d'une pipette multicanaux afin que la coloration se développe dans les mêmes conditions pour la gamme étalon et le contenu protéique de l'enzyme à doser. L'activité enzymatique est ainsi exprimée en activité amylasique spécifique (UI/mg de protéines totales) selon la formule suivante :

AS (UI/mg) = Activité enzymatique (UI) / taux de protéines (mg)

II.9.3. Cinétiques de croissance et de production d'amylase

Pour déterminer l'évolution dans le temps de la croissance bactérienne et de la production d'amylase extracellulaire, le bouillon LB additionné de 1% d'amidon est inoculé par 1% de la souche d'intérêt et incubé à 37°C sous une agitation à 150 rpm pendant une période de 90 heures. À chaque intervalle de temps de 6 h, la croissance ainsi que l'activité enzymatique sont mesurées à 600 nm et à 540 nm, respectivement (**Mageswari et** *al.*, **2012**).

II.9.4. Optimisation des conditions de culture pour la production d'amylase extracellulaire

Afin d'étudier l'effet de différents facteurs nutritionnels et physiques (**Tableau 10**) sur la production d'amylase, l'optimisation du processus en utilisant différents milieux synthétiques (**Tableau 11**) est réalisée par la méthode OVAT « *One Variable At a Time* » dans laquelle un seul paramètre ou facteur est modifié alors que les autres sont maintenus fixes (**Kumar et Khare, 2015**). Par la suite, la production d'amylase est réalisée dans les conditions optimales, et la croissance bactérienne ainsi que la production enzymatique sont mesurées à intervalles de temps réguliers. Une fois les paramètres sont optimisés, la possibilité de production de l'enzyme en utilisant des milieux à faible coût à base de déchets de cuisine et agricole est testée (**Suganthi et al., 2015 ; Hasan et al., 2017**).

Composition (g/L)			
Peptone, 10; extrait de levure, 5; NaCl, 10.			
Source de carbone, 1%; peptone 10; extrait de			
levure 5; NaCl, 10; K ₂ HPO ₄ , 0.87;			
MgSO ₄ .7H ₂ O, 6.2; KCl, 0.75.			
Déchet de cuisine, 2%; NaCl, 0.1%;			
$(NH_4)_2SO_4, 0.2\%; MgSO_4.7H_2O, 0.005\%;$			
CaCl ₂ , 0.005%.			
Source d'azote, 1% (p/v); amidon, 50;			
K ₂ HPO ₄ , 0.87; MgSO ₄ .7H ₂ O, 6.2; KCl, 0.75;			
NaCl, 50.			
Acide aminé, 0.01%; amidon, 50; K ₂ HPO ₄ ,			
0.87; MgSO ₄ .7H ₂ O, 6.2; KCl, 0.75; NaCl, 50.			
Ion métallique, 0.01%; amidon, 50; extrait de			
levure 15.			

Tableau 10. Composition des milieux de culture utilisés pour l'optimisation de la production d'amylase.

Paramètres physiques	Paramètres nutritionnels				
Température (25-45 °C)	Concentration saline (0-25%, p/v)				
pH (5-11)	Sources de carbone (sucres, acides, et alcools)				
Durée d'incubation (24, 48, 72 h)	Concentration de substrat (1-7%, p/v)				
Concentration d'inoculum (1-5%, v/v)	Déchets de cuisine (épluchures de légumes et de				
	fruits)				
Vitesse d'agitation (statique- 250 rpm)	Sources d'azote (sources organiques et				
	inorganiques, acides aminés)				
	Ions métalliques				

Tableau 11. Paramètres étudiés lors de l'optimisation du milieu de production de l'amylase.

II.9.4.1. Effet de la température et la période d'incubation sur la production d'amylase

Le milieu de production est inoculé par un volume de 1% de culture d'intérêt et incubé à différentes températures (25, 30, 35, 40 et 45°C) pendant des périodes variées (24 h, 48 h, 72h et 96 h) (**Mageswari et** *al.*, **2012**).

II.9.4.2. Effet du pH

La détermination du pH optimal est réalisée en utilisant le milieu de production ajusté aux différentes valeurs allant de 5 à 11 en utilisant des solutions tampons appropriées (tampon acétate pH 4-5, tampon phosphate pH 6-8 et tampon glycine-NaOH pH 9-11). L'incubation est faite sous agitation à 150 rpm et à température optimale (**Mageswari et** *al.*, **2012**).

II.9.4.3. Effet de la concentration en sel

Le milieu de production préparé aux différentes concentrations salines (0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 20%, 25%, p/v) et ajusté au pH optimum est inoculé avec 1% de la culture bactérienne et incubé à température optimale sous agitation à 150 rpm (**Mageswari et** *al.*, **2012**).

II.9.4.4. Effet de la vitesse d'agitation

Le milieu de production ayant les conditions optimales de teneur en sel et pH est ensemencé par 1% d'inoculum puis incubé à température optimale dans un incubateur-agitateur où la vitesse d'agitation a été variée de statique à 250 rpm (**Du et** *al.*, **2018**).

II.9.4.5. Effet de la concentration (volume) de l'inoculum

Le milieu de production est ensemencé dans les conditions optimales par un volume d'inoculum variant entre 1% et 5% (v/v) (Suganthi et *al.*, 2015).

II.9.4.6. Effet des sources de carbone

Différentes sources de carbone à concentration de 1% (p/v) ont été utilisées comme seule source de carbone. Le milieu (2) est inoculé avec 2% (v/v) de culture mère et incubé à 37 °C pendant 72 h sous agitation à 100 rpm (**Suganthi et** *al.*, **2015**).

Les sources de carbone utilisées sont représentées par des sucres simples et complexes comme le glucose, le tréhalose, le xylose, le lactose, le saccharose, la cellulose, la dextrine et l'amidon, des acides comme l'acide polygalacturonique et l'acide glycolique et des sucresalcools comme le mannitol et le sorbitol.

• Effet de la concentration du substrat (amidon)

Cet effet est étudié en utilisant le milieu (2) supplémenté en amidon comme source de carbone à différentes concentrations allant de 1 à 7% (p/v). Les autres conditions de culture sont maintenues optimales.

• Effet des sources alternatives de carbone

Les pelures de trois légumes (pomme de terre, carotte et courgette) et de trois fruits (melon, banane et mandarine) provenant de déchets de cuisine ont été utilisées pour créer sept milieux de culture dont le septième étant un mélange. Les pelures ont été séchées puis mélangées pour être utilisées comme source de carbone dans le milieu (3) à un pourcentage de 2% (Hasan et *al.*, 2017). Le pH des milieux formulés a été fixé au niveau optimal, pH 10. Après stérilisation, chaque milieu a été inoculé avec 2% de *B. flexus* puis la fermentation a été réalisée dans des conditions optimisées. Les substrats utilisés ont été correctement séchés à l'air et soumis à un broyage dans un mixeur de cuisine. La poudre fine a été passée à travers un tamis de 100 mailles, puis séchée à 80° C.

II.9.4.7. Effet des sources d'azote

L'effet de diverses sources d'azote inorganiques et complexes a été étudié en remplaçant l'extrait de levure et la peptone dans le milieu par d'autres sources d'azote à 1% (p/v) (milieu (4)), à savoir, le nitrate d'ammonium (NH₄NO₃), le nitrate de potassium (KNO₃), nitrate de sodium (NaNO₃), nitrate de calcium (Ca(NO₃)₂), chlorure d'ammonium (NH₄Cl), sulfate d'ammonium ((NH₄)₂SO₄), urée, gélatine, caséine, extrait de levure, extrait de bœuf, peptone, tryptone, combinaison de peptone et d'extrait de levure, et peptone et extrait de bœuf (Suganthi et *al.*, 2015).

II.9.4.8. Effet des acides aminés et des ions métalliques

L'effet des acides aminés et des ions métalliques sur la production d'amylase a été étudié dans des milieux de croissance optimisés (**5** et **6**, respectivement) avec 0.01% de chaque composant. Les acides aminés utilisés étaient la glycine, l'arginine, l'histidine, la glutamine, le glutamate et l'aspartate. De même, des ions métalliques tels que CaCl₂, KCl, NaCl, MnSO₄ et HgSO₄ ont été testés. Le milieu a été incubé à 37°C à 100 rpm et après une période de 72 h l'activité amylasique a été quantifiée. Le test de contrôle a été effectué sans aucun ion métallique (**Suganthi et al., 2015**).

II.10. Purification partielle de l'enzyme brute extracellulaire

La solution d'enzyme brute a été concentrée par ultrafiltration avec une membrane MWCO (*Molecular Weight Cut Off*) (Merck milipore Ltd) de 10 kDa, le rétentat est ensuite collecté puis re-concentré à nouveau avec une membrane MWCO de 30 kDa. Du sulfate d'ammonium solide a été ajouté lentement au surnageant, sous agitation constante à 4 °C, jusqu'à obtention d'une concentration finale de 70% de saturation, puis conservé toute la nuit à 4 °C. Les protéines précipitées ont été séparées par centrifugation à 4000 × g pendant 20 min à 4 °C et dissoutes dans un volume minimal de tampon phosphate 0.1 M (pH 7.2).

Le rendement (en pourcentage) et le facteur de purification sont calculés après chaque étape d'extraction et de purification selon les formules (**Berg et** *al.*, **2015**):

Rendement = (AT/AT de l'extrait brut) × 100 Facteur de purification = AS/AS de l'extrait brut

Avec :

AT : Activité amylasique totale.

AS : Activité amylasique spécifique.

II.10.1. Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE et zymographie de l'enzyme II.10.1.1. Électrophorèse SDS-PAGE

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE) a été réalisée selon la méthode décrite par **Laemmli (1970)** en utilisant un gel de séparation à 12% (p/v) et un gel d'empilement ou de concentration à 5% (p/v) (**Tableau 12**) où des puits créées à l'aide d'un peigne servent au dépôt et à la concentration des échantillons. Un tampon de chargement, contenant du bleu de bromophénol pour le suivi du front de migration et du dithiothréitol (DTT) comme agent réducteur, est utilisé pour la préparation des échantillons de protéines. 15 μ L d'échantillon protéique sont dissous dans 5 μ L d'un tampon de chargement 3X (150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 300 mM DTT, 6% SDS, 0.3% bleu de bromophénol, et 30% glycérol), chauffés à 95°C pendant 5 min puis chargés dans les puits du gel. Un puits est réservé au dépôt de 7.5 μ L d'un marqueur moléculaire (Thermo ScientificTM, *PageRulerTM Plus Prestained Protein Ladder*, Lituanie, 10.0-250.0 kDa).L'ensemble est mis dans une cuve d'électrophorèse remplie de tampon de migration 1X préparé à partir de la dilution de la solution mère 10X (Bio-Rad *SDS-PAGE running buffer*, 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3). La migration est effectuée à 200 V pendant 1 h, et à température ambiante. Après séparation des protéines, le gel d'acrylamide est démoulé et immergé dans une solution de *BlueSafe* (NZYTech) puis laissé à température ambiante pendant une heure sous agitation douce (Heidolph Polymax 1040 *Wave Shaker*). Les bandes de protéines se colorent en bleu permettant ainsi d'estimer le poids moléculaire relatif de l'enzyme par comparaison avec celui des marqueurs standards constituant le *PageRuler*.

Constituants	Gel de concentration 5% (p/v)	Gel de séparation SDS-PAGE 12% (p/v)
Eau Milli-Q (mL)	2.8	6
Tampon (mL)	1.25	4.68
Acrylamide/bis-acrylamide (mL)	0.82	7.2
APS 10% (μL)	35	90
TEMED (µL)	10	15
Volume final (mL)	5	18

Tableau 12. Composition des gels utilisés pour l'électrophorèse SDS-PAGE.

SDS-PAGE : *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis* ; APS : persulfate d'ammonium ; TEMED : N,N,N',N'-TétraMéthylEthylèneDiamine.

II.10.1.2. Zymographie de l'enzyme

Un gel réplique servant au développement d'un zymogramme est lancé parallèlement à celui de la SDS-PAGE. Les échantillons destinés à la zymographie ne sont pas chauffés avant l'électrophorèse et sont chargés dans les puits des deux gels en présence du marqueur moléculaire dans des puits séparés. L'électrophorèse est réalisée dans les mêmes conditions opératoires à 200 V pendant 1 heure et à température ambiante.

Après électrophorèse, le gel a été renaturé dans une solution à 2.5% (v/v) de Triton X-100 pendant 1 h sous agitation douce afin d'éliminer le SDS, lavé trois fois à l'eau distillée afin d'éliminer le Triton X-100 puis incubé durant 1 h à 55 °C dans une solution tampon glycine-NaOH 20 mM (pH 9) contenant 1 % (p/v) d'amidon soluble. Après incubation, il a été coloré avec une solution de lugol (0.3% I₂, 3% KI) pendant 15 min (**Kim et al., 2012**). Une zone

claire sur un fond sombre indique la localisation de l'amylase active. Le poids moléculaire de l'enzyme correspond à celui de la bande positive sur le gel de zymographie ayant la même distance frontale sur le gel SDS-PAGE.

Les gels sont enfin visualisés et photographiés sous lumière ultraviolette en utilisant un système d'imagerie Gel Doc[™] XR+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

II.10.2. Caractérisation de l'enzyme partiellement purifiée

II.10.2.1. Effet de la température sur l'activité et la stabilité

L'effet de la température sur l'activité enzymatique a été mesuré en incubant l'amylase partiellement purifiée dans 20 mM du tampon phosphate à pH 7.2 pendant 15 min à des températures comprises entre 4 et 100 °C. La thermostabilité a été déterminée en mesurant l'activité résiduelle après 1 h de pré-incubation de la solution enzymatique à la même gamme de température susmentionnée (**Du et al., 2018**).

II.10.2.2. Effet du pH sur l'activité et la stabilité

L'activité d'hydrolyse de l'amidon soluble a été dosée dans un mélange réactionnel où le pH a été varié entre 4 et 11 en utilisant 20 mM de solutions tampons appropriées (tampon acétate pH 4-5, tampon phosphate pH 6-8 et tampon glycine-NaOH 9-11). L'incubation est faite à 55°C durant 15 min. Afin de mesurer la stabilité au pH, l'enzyme a été pré-incubée à 30°C pendant 1 h dans un tampon à différentes valeurs de pH (la même gamme déjà citée). Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle à chaque valeur de pH (**Azad et** *al.*, **2013**).

II.10.2.3. Effet de la concentration en sel sur l'activité et la stabilité

L'enzyme amylase a été incubée à 55°C dans un tampon glycine-NaOH 20 mM (pH 9) contenant différentes concentrations de NaCl (0%, 1%, 2.5, 5%, 7.5%, 10%, 12.5%, 15%, 20%, 25%, p/v). Pour la détermination de la stabilité au sel, l'amylase a été pré-incubée pendant 1 h à 30 °C dans un tampon glycine-NaOH 20 mM (pH 9) contenant une gamme de concentrations salines allant de 0 à 25% (p/v). Les activités résiduelles exprimées en pourcentage sont mesurées aux optima de température et de pH (**Sahoo et al., 2016**).

II.10.2.4. Effet du temps de la réaction

Pour connaître le meilleur temps de réaction, le dosage enzyme-substrat a été réalisé dans des conditions de réaction optimales à différents temps de réaction allant de 5 à 30 min (**Hasan et** *al.*, **2017**).

II.10.2.5. Effet des ions métalliques sur l'activité et la stabilité

L'influence de divers ions métalliques à savoir NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, CuCl₂, NiCl₂, MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, AgNO₃, MoNa₂O₄, et HASNa₂ a été mesurée à une concentration finale de 10 mM dans les conditions optimales de réaction. Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'activité relative par rapport à l'activité du contrôle observée en absence des ions métalliques et considérée comme étant 100% (**Demirkan, 2011**).

Pour les effets stimulants ou inhibiteurs des ions métalliques sur l'activité enzymatique, l'amylase partiellement purifiée a été pré-incubée à 30°C avec 10 mM de chaque ion métallique pendant 1 h. Ensuite, l'activité restante a été calculée en utilisant le test enzymatique standard (Asoodeh et *al.*, 2010).

II.10.2.6. Effet des détergents et des surfactants sur l'activité et la stabilité

L'activité amylolytique a été estimée en présence de 10 mM de détergents tels que le Triton X-100 et le Tween 80 et de tensioactifs à savoir le SDS, le PMSF et le PEG 6000. Les solutions d'enzymes et de détergents ont été mélangées dans un rapport de 1:1 puis incubées à 55°C pendant 15 min. L'activité relative a été déterminée en considérant celle testée en l'absence d'inhibiteur comme 100%. La stabilité enzymatique a été mesurée en pré-incubant l'enzyme à 30°C pendant 1 h en présence de chacun des détergents et tensioactifs susmentionnés. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activité résiduelle (**Baltas et** *al.*, **2016**).

II.10.2.7. Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité

L'activité et la stabilité enzymatiques ont été estimées en présence d'une concentration de 10% de divers solvants tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone, le chloroforme, le glycérol, l'isoproponal et le DMSO. L'activité amylasique est mesurée selon la méthode DNS expliquée en **II.9.1** alors que la stabilité est estimée en incubant l'enzyme pendant 1 h en présence de chacun des solvants susmentionnés. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'activités relative et résiduelle (**Abdel-Fattah et** *al.*, **2013**).

II.10.2.8. Détermination de la spécificité au substrat

La spécificité au substrat a été vérifiée en présence des solutions 1% (p/v) de différents types de substrats tels que l'amidon, la pectine, la carboxyméthylcellulose (CMC), le xylane, l'arabinane, le β -glucane, l'arabinoxylane de blé et le xylane de bois de hêtre. Les substrats d'amidon brut utilisés étaient la paille de riz et les pelures broyées de carottes, de mandarines

et de bananes. L'activité amylasique est dosée selon la méthode DNS déjà mentionnée et expliquée en **II.9.1**.

II.10.2.9. Détermination de la stabilité au stockage

Pour déterminer la stabilité enzymatique au stockage, des aliquotes d'enzyme ont été stockées pendant 10 jours à différentes températures (-18°C, 4°C et 25 ± 2 °C). Après un intervalle de temps de 2 jours, des aliquotes de chaque température de stockage sont prélevés et l'activité enzymatique résiduelle est mesurée selon la méthode de dosage standard (**Amid et** *al.*, **2014 ; Hasan et** *al.*, **2017**).

La stabilité au stockage de l'enzyme est déterminée selon la formule ci-après :

Stabilité au stockage (%) = A/A₀×100

Où :

 \mathbf{A}_{0} : Activité enzymatique avant stockage,

 ${\bf A}$: Activité enzymatique après stockage.

II.11. Production de l'amylase par deux types de fermentation en présence des substrats d'amidon brut

II.11.1. Fermentation submergée (SmF)

La fermentation submergée est réalisée dans des Erlenmeyers contenant 50 mL d'un milieu de culture constitué uniquement de 1 % (p/v) de chaque substrat d'amidon brut (paille de riz et un mix de pelures broyées de carottes, mandarines et de bananes) à pH10. Le milieu de fermentation est ensemencé par un inoculum uniforme 2% (v/v) puis incubé dans un agitateur-incubateur à 37°C sous une agitation de 100 rpm pendant 6 jours. Les flacons sont retirés chaque jour pour vérifier la production d'amylase. Après centrifugation du milieu de fermentation à 4000 × g pendant 30 min, le surnageant obtenu est dosé pour la présence de l'activité amylasique en appliquant la méthode DNS comme déjà décrit en **II.9.1 (Saxena et Singh, 2011)**.

II.11.2. Fermentation en milieu solide (SSF)

Le processus de fermentation a été réalisé dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 5 g de paille de riz et un mix de pelures de carottes, de mandarines et de bananes. De l'eau Milli-Q a été ajoutée de manière à ce que le taux d'humidité final du substrat soit de $80 \pm 5\%$ (p/v). Après stérilisation par autoclave, les flacons ont été refroidis et inoculés avec un volume d'inoculum de 2% (v/v) (Lonsane et *al.*, 1985). L'incubation est réalisée à 37°C pendant 6

jours. Les flacons de milieu SSF ont été doucement agités dans un agitateur rotatif orbital toutes les 24 heures. Le surnageant a été obtenu après avoir mélangé la matière fermentée avec de l'eau Milli-Q, dans un rapport de 1:5 (p/v). Les mélanges sont ensuite agités à 100 rpm pendant 30 min à 37°C dans un agitateur rotatif puis homogénéisés en 3 cycles de 15s (**Balkan et al., 2011**). Après filtration des mélanges obtenus sur papier filtre Whatman n°1, les filtrats ont été centrifugés à 4000 × g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant résultant a été utilisé pour estimer la production de l'enzyme. L'activité enzymatique a été testée à pH 9 par la méthode DNS en utilisant 1% (p/v) d'amidon soluble comme substrat à 55°C pendant 15 min (**Saxena et Singh, 2011**).

II.12. Applications industrielles possibles de l'amylase produite par Bacillus flexus AC12

Compte tenu des nombreuses applications des enzymes microbiennes dans divers secteurs industriels, l'amylase produite par *Bacillus flexus* AC12 a été étudiée pour une éventuelle utilisation dans différents processus industriels.

II.12.1. Clarification du jus de pomme

Les pommes vertes ont été coupées en cubes, écrasées dans un mixeur Philips HR 3571/90 puis pressées manuellement à l'aide d'une étamine à double couche pour obtenir du jus de pomme brut ou non clarifié. A ce dernier est ajouté l'amylase partiellement purifiée, le mélange est ensuite incubé à 55 °C pendant 4 h. Après incubation et afin de vérifier la clarté du jus, le pourcentage de transmission à 650 nm a été déterminé chaque une heure (**Kothari et** *al.*, **2013 ; Dey et** *al.*, **2014**). Un essai contrôle est réalisé en absence de l'enzyme. Parallèlement, la quantité de sucres réducteurs dans le jus est déterminée par la méthode DNS (**Sharma et Chand, 2012 ; Kumar et** *al.*, **2011**). La même expérience de clarification du jus a été également menée à température ambiante.

La clarification du jus est calculée par la formule suivante :

Clarification (%) = T_t - $T_c / T_c \times 100$

Où :

 T_t : Transmission du test,

 T_c : Transmission du contrôle.

II.12.2. Compatibilité de l'amylase avec les détergents de commerce

Six marques de détergents disponibles localement en Espagne (Ariel, Marsella, Vernel, Pronto, Diluido, Aro, Limón, Lejía) ont été utilisées pour déterminer leur compatibilité avec les propriétés détergentes de l'amylase produite par *Bacillus flexus* AC12 dans des conditions optimales.

Les solutions détergentes 1% (v/v) ont été préparées dans de l'eau Milli-Q puis bouillies à 100°C pendant 30 min dans le but de dénaturer l'enzyme native présente dans les solutions. Après filtration, elles ont été mélangées à l'enzyme dans un rapport 1:1 et incubées à 55°C pendant 15 min. Après incubation, chaque solution est mélangée dans un rapport de 1:1 avec une solution d'amidon à 1% (p/v) préparée dans 20 mM du tampon glycine-NaOH à pH 9. Le dosage de l'activité amylasique est réalisé comme a été décrit précédemment. La compatibilité de l'amylase avec ces détergents est exprimée en pourcentage d'activité relative par rapport à un essai témoin où l'enzyme a été diluée à 1:1 dans de l'eau sans détergent. L'activité enzymatique de l'échantillon témoin est considérée comme étant de 100% (Suganthi et *al.*, 2015).

II.13. Analyse statistique

Les données ont été soumises à une analyse de variance (ANOVA) en utilisant le test *post-hoc* de Tukey. Le niveau de signification est défini à p < 0.01 en utilisant la version 23.0 du logiciel SPSS (*Statistical Package for Social Sciences* pour Windows ; SPSS Inc., Chicago, IL).

Résultats

et Discussion

III. 1. Détermination des paramètres physiques des anchois frais

Les caractéristiques des anchois crus en termes de longueur, de poids et du nombre de poissons dans 1 kg sont résumées dans le tableau **13**.

La longueur moyenne des poissons était presque la même pour les trois échantillons (13 \pm 0.00 à 13 \pm 0.82 cm), alors que le poids moyen variait légèrement, ce qui indique leur maturité sexuelle et saisonnière. Ces valeurs sont inférieures à celles trouvées par **Šimat et Bogdanović (2012)** qui ont enregistré une longueur moyenne de 15.23 \pm 0.68 cm et un poids moyen de 24.72 \pm 3.64 g, et supérieures à celles trouvées par **Sofoulaki et** *al.* (2018) qui ont enregistré une longueur moyenne et 11.33 \pm 0.52 cm et un poids moyen entre 3.9 \pm 0.6 g et 8.2 \pm 1.3 g.

En outre, le nombre de poissons dans 1 kg de chaque échantillon, était de 70 ± 1.00 , 66 ± 0.57 , et 66 ± 0.57 pour les échantillons S, I, D, respectivement. Selon **Arrignon (1966)**, 1 kg d'anchois doit contenir 50 éléments de poisson. Ces éléments mesurent entre 8 et 19 cm et ont une longueur moyenne et un poids moyen de 14 cm et 20 g, respectivement. Nos résultats sont en accord avec ces données en ce qui concerne la longueur. Cependant, le poids moyen était plus faible avec une différence d'environ 6 g, ce qui explique la différence du nombre de poissons dans 1 kg entre ce qui a été rapporté et ce qui a été trouvé.

III. 2. Evaluation sensorielle

En terme de qualité organoleptique, l'acceptabilité globale du poisson, mesurée sur une échelle de qualité à 8 points (**Filsinger et** *al.*, **1982**), était de 3.76, 3.12 et 4.08 pour les échantillons S, I et D, respectivement (**Tableau 13**), ce qui correspond à un produit semi-mûr. Cela pourrait être dû à des variations dans l'historique temps-température du poisson. Ces scores sont inférieurs à ceux obtenus par **Czerner et Yeannes (2013)**, qui ont rapporté une note sensorielle moyenne de 5.6, 5.1 et 4.5.

Filsinger (1987) a conclu que la meilleure qualité sensorielle du produit correspondait à une pression intermédiaire. D'un côté, une pression plus élevée augmentait la pénétration du sel et diminuait la vitesse de maturation, et par conséquent les produits obtenus ne possédaient pas les meilleures caractéristiques sensorielles et de l'autre côté, une pression plus faible a modifié le processus de maturation et a donné un produit trop mûr. Ces résultats sont en contraste avec les nôtres, cela est peut-être lié à la procédure selon laquelle la technique de salage a été appliquée.

Caractéristiques	Échantillons							
	S	Ι	D					
Caractéristiques physiques des anchois frais								
Longueur (cm)	13.0 ± 0.82^{a}	13.0 ± 0.00^{b}	$13.0 \pm 0.00^{\circ}$					
Poids (g)	13.4 ± 2.97^a	13.0 ± 0.71^{a}	$13.5\pm1.73^{\rm a}$					
Nombre de poissons dans 1 kg	70.0 ± 1.00^{a}	$66.0\pm0.57^{\text{a}}$	66.0 ± 0.57^{a}					
Car	actéristiques senso	orielles						
Scores moyens	3.76 ± 0.50^{a}	$3.12\pm1.05^{\text{b}}$	$4.08\pm0.09^{\rm c}$					
Caracte	éristiques physicoc	himiques						
pH	5.81 ± 0.04^a	5.75 ± 0.03^{b}	5.66 ± 0.02^{c}					
ATT (% d'acide oléique)	0.06 ± 0.10^{a}	0.06 ± 0.10^{a}	$0.08\pm0.10^{\rm a}$					
Taux d'humidité (%)	57.5 ± 0.10^{a}	55.0 ± 0.20^{b}	$52.5\pm0.10^{\rm c}$					
Teneur en matière sèche (%)	42.5 ± 0.10^{b}	45.0 ± 0.20^{a}	47.5 ± 0.10^{c}					
Teneur en protéines brutes	$1.37\pm0.63^{\rm a}$	$1.32\pm0.19^{\rm a}$	$1.28\pm0.35^{\rm a}$					
(%)								
Teneur en matière grasse (%)	4.25 ± 0.08^{b}	$4.69\pm0.12^{\rm a}$	$5.38\pm0.15^{\rm c}$					
Teneur en cendres (%)	35.0 ± 0.10^a	36.0 ± 0.30^{b}	40.5 ± 0.10^{c}					
Teneur en sel (%)	34.7 ± 0.90^a	35.1 ± 0.20^{b}	40.3 ± 0.30^{c}					
Ip(meq O ₂ /kg de gras)	$0.\overline{50\pm0.00}^{a}$	0.5 ± 0.00^{b}	0.75 ± 0.05^c					
Ia (mg KOH/g))	5.74 ± 0.50^a	7.17 ± 0.50^{a}	7.89 ± 1.00^{a}					
Is (mg KOH/g)	102.38 ± 0.70^a	75.73 ± 0.40^{b}	$91.27\pm0.50^{\rm c}$					

Tableau 13. Caractéristiques physiques, sensorielles et physicochimiques des différents

 échantillons d'anchois salés-mûrs.

S: Echantillon prélevé de la partie superficielle ; I : Echantillon prélevé de la partie intermédiaire ; D : Echantillon prélevé de la partie profonde. ATT: Acidité Titrable Totale ; Ip: Indice de peroxyde ; Ia: Indice d'acide ; Is : Indice de saponification. ^{a-c} Les valeurs sur la même ligne et marquées d'une lettre différente différent significativement (p < 0.01).

III. 3. Composition proximale et analyse physicochimique des anchois

III. 3.1. Détermination du pH et de l'acidité titrable totale (ATT)

Les valeurs du pH étaient significativement différentes dans les trois échantillons (p < 0.01), alors qu'il n'y avait pas de différence significative entre les valeurs d'acidité titrable totale (ATT) (p > 0.01). Ces résultats sont en accord avec la plupart des données rapportées dans la littérature (Hernández-Herrero et *al.*, 1999, 2002; Llorente Holgado et *al.*, 2007; Ababouch et El Marrakchi, 2009).

Les différences significatives des valeurs de pH entre les trois échantillons pourraient s'expliquer par la différence de concentration en sel et de profondeur à laquelle chaque échantillon a été prélevé. Il a été suggéré que la concentration en sel influence non seulement l'activité de l'eau, mais aussi le pH (**Rodríguez-Jerez et** *al.***, 1993; Hernández-Herrero et** *al.***, 1999**). Une diminution du pH est généralement expliquée par l'augmentation de la force ionique de la solution au sein des cellules (**Ormanci et Colakoglu, 2015**).

Selon Ababouch et El Marrakchi (2009), le pH du muscle d'anchois diminue de 6 à 5.4 après 3 à 4 mois du processus de maturation. Cette diminution, qui est d'une part essentiellement attribuée à l'accumulation des acides gras libres, se fait malgré une augmentation significative des bases azotées, notamment le NH₃. D'autre part, cette baisse de pH peut également être attribuée au fait que les échantillons aient subi une fermentation plutôt qu'une altération. Dans la même analogie, les valeurs élevées de l'acidité, se variant entre 0.06 ± 0.10 et $0.08 \pm 0.10\%$ d'acide oléique, semblent être due à la production de divers acides organiques, y compris les acides gras libres. Cela implique que le poisson a subi une fermentation suffisante par voie enzymatique sous l'action des enzymes endogènes et/ou exogènes (d'origine microbienne) (Majumdar et Basu, 2010).

III. 3.2. Détermination des teneurs en sel, en eau et en matière sèche

Les teneurs en sel et en eau variaient entre les trois échantillons de manière très significative (p < 0.01) (Tableau 13). La teneur en sel dans l'échantillon S, était la plus faible (34.7 ± (0.90%) alors que la plus élevée a été enregistrée dans l'échantillon D ($40.3 \pm 0.30\%$). Ces niveaux élevés de teneur en sel peuvent être attribués aux conditions de préparation traditionnelles ainsi qu'à l'absorption d'humidité due à l'humidité hydrostatique du sel pendant le stockage (Dewi et al., 2011). Le processus de salage des anchois comprend la diffusion du sel dans le poisson et l'élimination de l'eau par osmose. La perte d'humidité du poisson due à l'osmose a entraîné une diminution de la teneur en eau ainsi qu'une augmentation de la teneur en sel et en cendres dans le produit final (Hernández-Herrero et al., 2002; Majumdar et Basu, 2010). En outre, le taux de pénétration du sel dans le muscle est fortement influencé par la teneur en graisse, la fraîcheur du poisson, l'épaisseur de la chair, le rapport surface/volume et la température (Clucas, 1982). Nous suggérons que la fraîcheur du poisson dans l'échantillon S avait légèrement réduit le taux d'absorption du sel. La teneur en sel dans notre étude est considérablement plus élevée que celle rapportée par plusieurs auteurs (Ababouch et El Marrakchi, 2009; Czerner et Yeannes, 2014; Zang et al., 2019). Cela pourrait être dû au processus de salage non contrôlé et non réglementé appliqué selon la méthode artisanale.

La matière sèche a également varié de manière hautement significative entre $42.5 \pm 0.1\%$ et $47.5 \pm 0.1\%$ (p < 0.01). La valeur de l'échantillon S était entre celles des deux autres

échantillons. Comme le montre le tableau **13**, il existe une relation claire inversement proportionnelle entre les teneurs en sel, en humidité et en matière sèche.

III. 3.3. Détermination de la teneur en cendres

Les teneurs en cendres permettent d'estimer la composition minérale ainsi que la quantité de sel résiduel dans les produits de la pêche. Les teneurs élevées en cendres $(35.0 \pm 0.1 - 40.5 \pm 0.1\%)$ pourraient essentiellement être attribuées à la teneur élevée en sel, à la taille du poisson et éventuellement aux fragments d'os qui n'ont pas été retirés des échantillons d'anchois pendant le traitement (**Selmi et al., 2010**). En comparant nos résultats avec ceux obtenus par **Hernández-Herrero et al. (1999**), il s'est avéré que la teneur en protéines était plus faible alors que les niveaux de cendres et de sel étaient plus élevés.

III. 3.4. Détermination de la teneur en matière grasse

Les teneurs en lipides totaux ont montré une variation très significative (p < 0.01) allant de 4.25 ± 0.08 à $5.38 \pm 0.15\%$, avec une valeur plus élevée enregistrée pour l'échantillon D ($5.38 \pm 0.15\%$). La teneur en lipides de la chair d'anchois peut différer non seulement entre les espèces mais aussi au sein d'une même espèce provenant d'une même capture. Ceci est dû aux différents stades de maturité (**Pigott et Tucker, 1987**). Cette différence de valeurs entre les échantillons pourrait également être expliquée par la forte teneur en sel dans l'échantillon D ($40.3 \pm 0.30\%$) par rapport aux deux autres. Contrairement à nos résultats **Shiriskar et al.** (**2010a, 2010b**) ont révélé une légère variation dans la teneur en lipides.

Chez la plupart des poissons, notamment les espèces pélagiques, la somme totale des deux principaux constituants (humidité et lipides) représente environ 78 à 80% du poids total. Cette somme est plus faible pour les trois échantillons de la présente étude. Nos résultats ont également révélé une relation inverse entre la teneur en humidité et la teneur en matières grasses, ce qui est cohérent avec les résultats des études précédentes qui ont étudié la relation entre la teneur en matières grasses et la teneur en eau (Gökoglu et al., 1999; Šimat et Bogdanović, 2012). Les auteurs ont signalé une très forte corrélation négative entre ces deux paramètres et ont conclu que l'existence d'une telle relation permettrait d'estimer la teneur en matières grasses à l'aide de la teneur en eau. Cela ne remplacerait pas les procédures standards de mesure précise de la teneur en matière grasse, mais permettrait aux transformateurs de faire une estimation.

III. 3.5. Détermination de la teneur en protéines brutes

La teneur en protéines s'est avérée plus faible, elle variait entre $1.28 \pm 0.35\%$ et $1.37 \pm 0.63\%$. Ce résultat est en concordance avec celui trouvé par **Nketsia-Tabiri et Sefa-Dedeh (1995)** durant le processus de salage du tilapia. La forte concentration en sel à l'intérieur du poisson pendant le salage entraîne une perte des protéines solubles et une perte de la capacité de rétention d'eau, ce qui entraîne une dénaturation des protéines (Kong et *al.*, 2008). Des recherches antérieures ont montré que les protéines solubilisées (à la suite du processus de salage) avaient un effet osmotique supplémentaire et contribuaient à l'obtention de l'état d'équilibre (Czerner et Yeannes, 2010).

III. 3.6. Détermination des indices de peroxyde, de saponification et d'acide

Les indices de peroxyde et de saponification ont montré une variation hautement significative entre les trois échantillons (p < 0.01). La teneur en acides gras libres était comprise entre 5.74 ± 0.50 et 7.89 ± 1.00 mg KOH/g.

La faible valeur de l'indice de peroxyde (entre 0.50 ± 0.00 et 0.75 ± 0.05 meq O₂/kg de gras) indique que l'oxydation a été bien développée au point où les hydro-peroxydes ont été déjà décomposés et transformés (**Adrian et al., 1998**). Ceci est en accord avec les résultats tirés par **Smith et al. (1988**) qui ont confirmé que les conditions de salage accélèrent l'oxydation des lipides. En outre, il a été également signalé que l'oxydation enzymatique jouaient un rôle important dans la détérioration oxydative du poisson salé (**Cho et al., 1989**).

La valeur la plus élevée de l'indice de saponification a été enregistrée pour l'échantillon S $(102.38 \pm 0.70 \text{ mg KOH/g})$, reflétant ainsi sa teneur élevée en acides gras à chaînes courte et moyenne. En outre, l'échantillon D a donné la teneur la plus élevée en acides gras libres (7.89 \pm 1.00 mg KOH/g). Des recherches antérieures ont montré que le sel n'avait aucun effet inhibiteur sur les lipases, qui sont responsables de la libération des acides gras libres (**Perez-Villareal et Pozo, 1992**). Cela pourrait signifier davantage que les acides gras insaturés ont été produits et soumis à une hydrolyse oxydative au niveau de leurs doubles liaisons. Les substances résultantes, principalement des cétones et des aldéhydes, semblent être en grande partie responsables de la saveur, de l'odeur et du goût de ces produits (**El-Sebaiy et Metwalli, 1989**).

III. 3.7. Détermination de la composition en acides gras

Des variations ont été observées dans les profils des acides gras (**Tableau 14**). Les acides gras saturés (AGS) sont les acides gras les plus courants dans tous les échantillons. Les principaux acides gras saturés (AGS) étaient les C16:0 et les C18:0, avec un pourcentage plus élevé de C16:0. Ce résultat est conforme aux recherches précédentes, qui ont rapporté que le C16:0 était l'acide gras le plus abondant dans les anchois et dans presque toutes les espèces de poissons (**Bayir et al., 2006 ; Özogul et al., 2007**). De même, les teneurs en acides gras

mono-insaturés (AGMI) et en acides gras polyinsaturés (AGPI) se sont révélées être plus élevées dans les anchois prélevés des couches superficielles et profondes, respectivement. La teneur en AGPI augmente avec la profondeur. Les acides gras C16:0 et C18:1 étaient prédominants dans tous les échantillons. C2:0, C16:0 et C18:1 ont diminué avec la profondeur, alors que C18:0 et C18:2 ont augmenté. En outre, seul l'échantillon D contenait de l'acide docosahexaénoïque (DHA ; C22:6) avec un pourcentage de 2.42% tandis que la teneur en acide eicosapentaénoïque (EPA ; C20:5), qui n'était présent que dans les deux échantillons I et D, a montré une teneur plus élevée dans l'échantillon D, avec un pourcentage de 1,18 ± 0.24%. Selon **Bayir et al. (2006)**, l'anchois contient 11.68% d'EPA et 25.85% de DHA. En outre, Zlatanos et Laskaridis (2007) ont constaté que les niveaux d'EPA et de DHA dans l'anchois variaient de 2.46 à 12.4%, et de 12.23 à 32.46%, respectivement, en fonction de la saison. Saglik et Imre (2001) ont rapporté des teneurs en EPA et en DHA (g/100g) de 0.86 et de 1.56 g, respectivement. Nos résultats sont plus proches de ceux obtenus par Zlatanos et Laskaridis (2007) pour le taux en DHA et par Saglik et Imre (2001) pour la teneur en EPA. L'anchois, le hareng de l'Atlantique et le saumon d'élevage et sauvage contiennent, par ordre décroissant, 2055 à 1840 mg/100 g d'EPA+DHA, tandis que le maquereau de l'Atlantique, le poisson bleu, les sardines de l'Atlantique et la truite contiennent de 1203 à 936 mg/100 g (Mozaffarian et Wu, 2011).

Acides gras (%)	Échantillons							
	S	Ι	D					
Acides gras saturés (AGS)								
Acide oxalique (C2:0)	$01.47\pm0.00^{\mathrm{a}}$	$0.61\pm0.01^{\text{b}}$	$00.41\pm0.01^{\circ}$					
Acide caprylique (C8:0)	nd	nd	00.17 ± 0.00					
Acide caprique (C10:0)	02.02 ± 0.08	nd	00.18 ± 0.13					
Acide laurique (C12:0)	nd	nd	00.26 ± 0.08					
Acide pentadécylique (C15:0)	nd	nd	01.63 ± 0.11					
Acide palmitique (C16:0)	$42.03\pm0.10^{\text{a}}$	$38.24\pm0.06^{\rm a}$	$36.21\pm0.15^{\rm a}$					
Acide margarique (C17:0)	nd	nd	01.73 ± 0.13					
Acide stéarique (C18:0)	$08.78\pm0.18^{\rm a}$	11.11 ± 0.27^{b}	$13.19\pm0.07^{\text{c}}$					
Acide arachidique (C20:0)	nd	nd	00.35 ± 0.15					
Acides gras mono-insaturés (AGMI)								
Acide hexadécanoïque (C16 Δ^7)	nd	nd	00.65 ± 0.00					
Acide palmitoléïque (C16 ⁴⁹)	01.99 ± 0.01	nd	00.23 ± 0.01					
Acide oléique (C18 Δ^9)	$29.46\pm0.00^{\rm a}$	$22.42\pm0.03^{\text{b}}$	$22.24\pm0.07^{\rm c}$					
Acide vaccénique (C18 ¹¹)	nd	nd	03.60 ± 0.05					
Acide gondoïque (C20 ¹¹)	nd	nd	00.27 ± 0.00					
Acides gras	polyinsaturés (A	GPI)						
Acide octadécadiénoïque (C 18 $\Delta^{8, 11}$)	$02.05\pm0.33^{\text{a}}$	$04.01\pm0.08^{\text{b}}$	$04.70\pm0.03^{\circ}$					
Acide eicosapentaénoïque	nd	01.10 ± 0.10	01.18 ± 0.24					
$(C 20 \Delta^{5,8,11,14,17})$								
Acide docosahexaénoïque	nd	nd	02.42 ± 0.17					
$(C 22 \Delta^{4,7,10,13,16,19})$								
$\sum AGS$	$5\overline{4.30\pm0.36}$	49.96 ± 0.34	54.13 ± 0.83					
∑AGMI	31.45 ± 0.01	22.42 ± 0.03	26.99 ± 0.13					
∑ AGPI	02.05 ± 0.33	05.11 ± 0.18	08.30 ± 0.44					
a de man d'Arack								

Tableau 14. Composition en acides gras des échantillons d'anchois salés-mûrs.

nd: non détecté,

^{a-c} Les valeurs sur la même ligne et marquées d'une lettre différente différent significativement (p < 0.01).

III. 3.8. Détermination de la teneur en matière minérale et éléments traces métalliques Le poisson est une bonne source de minéraux qui sont hautement nécessaires au fonctionnement normal de l'organisme. Les oligo-éléments et les éléments traces métalliques Zn, Mn, Fe et Cu étaient présents dans une fourchette de 0.0066 ± 0.003 à 0.4056 ± 0.032 ppm dans le poisson (**Tableau 15**). La teneur en minéraux et en métaux peut varier en fonction du milieu environnant (**Sen et al., 2011**). Le zinc (Zn) était le principal minéral remarqué dans tous les échantillons avec un niveau plus élevé trouvé dans l'échantillon I (0.4056 ± 0.032 ppm), suivi par le fer (Fe) avec une teneur importante enregistrée pour l'échantillon I (0.2091 ± 0.022 ppm). Nos résultats sont inférieurs à ceux rapportés par plusieurs auteurs (Galațchi et al., 2017; Afandi et al., 2018; Sofoulaki et al., 2018).

D'après les résultats du tableau **15**, le cadmium et le plomb étaient inférieurs aux niveaux autorisés par la législation Européenne (0.30 μ g/g ou 0.30 ppm) et le chrome était inférieur à la teneur enregistrée par **Chandrashekar et Deosthale**, (**1993**) et **Afandi et** *al***. (2018**) qui avaient rapporté une valeur de 69.3 μ g/100 g et 0.27 ± 0.442 μ g/g, respectivement.

Les variations de la bioaccumulation des métaux entre les espèces ont été attribuées principalement à des régimes alimentaires et des niveaux trophiques différents (**Renieri et al., 2014**). Pendant son cycle de reproduction, l'anchois ne consomme que des aliments à haute valeur énergétique, ce qui augmente son intensité alimentaire (**Karachle et Stergiou, 2013**). Enfin, divers paramètres intrinsèques tels que la taille du corps, l'âge, le sexe (**Sarkar et al., 2008**) ainsi que la composition proximale (teneurs en lipides et en protéines) (**Kalantzi et al., 2016; Sofoulaki et al., 2018**) ont également été proposés pour expliquer les différences de bioaccumulation ou de charge métallique entre différentes espèces.

	Échantillons				
	S	Ι	D		
	Éléments minér	caux (ppm)			
Zinc (Zn)	$0.2219 \pm 0.002^{\rm a}$	0.4056 ± 0.032^{b}	$0.3344 \pm 0.015^{\circ}$		
Manganèse (Mn)	0.0562 ± 0.001^{a}	0.0351 ± 0.005^{b}	$0.0066 \pm 0.003^{\rm c}$		
Fer (Fe)	0.1351 ± 0.010^{a}	$0.2091 \pm 0.022^{\text{b}}$	$0.0777 \pm 0.034^{\rm c}$		
Cuivre (Cu)	0.0247 ± 0.017^{a}	$0.0332 \pm 0.022^{\rm a}$	$0.0570 \pm 0.013^{\rm a}$		
	Métaux louro	ls (ppm)			
Plomb (Pb)	$0.0264 \pm 0.002^{\rm a}$	0.0966 ± 0.004^{b}	$0.1142 \pm 0.009^{\rm c}$		
Chromium (Cr)	0.0256 ± 0.092^{a}	$0.0584 \pm 0.111^{\rm a}$	$0.0531 \pm 0.102^{\rm a}$		
Cadmium (Cd)	$0.0212 \pm 0.001^{\rm a}$	$0.0119 \pm 0.003^{\rm a}$	$0.0132 \pm 0.001^{\rm a}$		

 Tableau
 15. Teneurs en éléments minéraux et traces métalliques des échantillons

 d'anchois salés-mûrs.

^{a-c} Les valeurs sur la même ligne et marquées d'une lettre différente diffèrent de manière significative (p < 0.01).

Par conséquent, il est très important de souligner qu'il y avait un effet de profondeur sur l'ensemble des caractéristiques de qualité du poisson. Cet effet est beaucoup plus lié à l'influence de la pression sur le processus de salage et de maturation des anchois. Selon les données de la littérature, le principal problème de la méthode de salage en cuve ou en tonneau est l'irrégularité du produit, car la hauteur du tonneau et la pression exercée par le poids peuvent créer différentes concentrations de sel à différents niveaux dans le même tonneau. Pour éviter cela, les couches supérieures doivent recevoir près de deux fois plus la quantité de sel que les couches inférieures. En outre, le saumurage, à un niveau d'environ 70%, est une méthode plus rapide de conservation du poisson. Plus la concentration de sel est faible et plus le poisson est gras, plus la période de saumurage nécessaire pour garantir une durée de conservation prolongée sera longue. Le principal problème rencontré ici est que, une fois le poisson absorbe le sel de la saumure et libère l'eau des tissus, la saumure se dilue. Il faut donc ajouter du sel régulièrement (périodiquement) et remuer fréquemment la solution pour s'assurer que le sel ajouté ne se dépose pas (**Curtis, 1993**). Dans notre cas, et sur la base d'une discussion informelle avec le vendeur, cet effet de profondeur a été principalement attribué à la façon selon laquelle la technique de traitement ou de salage a été appliquée. Ses informations indiquent que les couches supérieures n'avaient reçu aucune quantité supplémentaire de sel.

Des études antérieures (Ahmed et al., 2010; Alsaban et al., 2014), avaient souligné une relation négative entre la teneur en matière grasse et le taux d'humidité. Ce type de relation est également confirmé par nos résultats, mais non seulement entre les deux paramètres susmentionnés. Il y avait également une relation inverse entre la teneur en cendres et le taux d'humidité, la teneur en sel et le taux d'humidité, et l'indice d'acide et le taux d'humidité. L'autre observation à relever est la relation directe entre le taux en protéines brutes et la teneur en eau. Il est nécessaire de noter que tous ces résultats soient profondément liés à la différence des niveaux de profondeur, du superficiel au plus profond. En poursuivant cet ordre d'idées, une nette augmentation des pourcentages d'acides gras polyinsaturés est remarquée au fur et à mesure que les niveaux de profondeur augmentaient. Il n'y a pas de données récentes qui expliquent clairement cette influence sur la composition proximale des anchois salés-mûrs traditionnels, mais il est clair que la différence de profondeur à partir de laquelle nous avons prélevé nos échantillons était un facteur significatif.

III.4. Analyse microbiologique

D'après les résultats du tableau **16**, le nombre des bactéries aérobies mésophiles était compris entre $2.0 \times 10^4 \pm 1.0$ et $4.0 \times 10^4 \pm 1.1$ UFC/g, alors que le nombre des bactéries lactiques était compris entre $1 \times 10^6 \pm 0.7$ et $1.3 \times 10^7 \pm 0.1$ UFC/g. Les levures et moisissures n'ont été trouvées que dans l'échantillon S (10 UFC/g). Aucune colonie de coliformes totaux, thermotolérants, staphylocoques et *Clostridium sulfito-réducteurs* n'a été observée. Les résultats obtenus étaient en accord avec les limites des critères microbiologiques fixés par le Journal Officiel de la République Algérienne (2017). Il ressort clairement des résultats que l'absence presque totale des flores d'altération et pathogènes soit principalement due à l'effet conservateur du sel, qui entraîne une diminution de l'activité de l'eau, favorisant ainsi une moindre disponibilité aux attaques microbiennes et une amélioration des propriétés fonctionnelles (Santiago et Maurizio, 2002).

Le nombre de bactéries halophiles aux concentrations salines finales de 5 % et 10 % (p/v) était compris entre $1.23 \times 10^3 \pm 0.83$ et $2.64 \times 10^3 \pm 0.55$ UFC/g et $1.12 \times 10^3 \pm 1.00$ et $1.43 \times 10^3 \pm 0.59$ UFC/g, respectivement (**Tableau 16**). Des données antérieures ont rapporté que la flore halophile variait entre 1.0×10^4 UFC/g et 6.4×10^4 UFC/g à des concentrations en sel comprises entre 5 et 10% après 73 jours de maturation de l'anchois (**Czerner et Yeannes, 2014**). Cette population halophile de l'anchois représente la charge bactérienne présente dans l'environnement marin. Ces bactéries halophiles sont naturellement présentes dans la couche externe de la peau et sur les branchies et les intestins des poissons marins (**Prescott et al., 1996**). Les méthodes de transformations telles que la manipulation, le stockage et les techniques appliquées pour la préservation de la qualité, y compris le processus de salage, peuvent également affecter le nombre de bactéries halophiles du poisson.

Une augmentation graduelle du nombre de bactéries halophiles a été observée de la partie superficielle à la partie profonde (**Tableau 16**). Cette variation du nombre de bactéries pourrait être liée d'une part à la concentration initiale de micro-organismes dans la phase de pré-salage où les bactéries halophiles provenant du sel pourraient se développer dans une certaine mesure avant d'être en contact avec les anchois (**Perez et al., 2018**), et d'autre part à l'augmentation graduelle de la salinité créée par la différence de profondeur ainsi que la technique de salage appliquée, qui donne par la suite un nombre plus élevé ou plus faible de la microflore halophile. Pendant le processus de maturation de l'anchois salé, la microflore halophile s'est avérée être dominée par des bactéries modérément et extrêmement halophiles, montrant un rôle important dans le processus de maturation (**Czerner et Yeannes, 2014 ; Felix et al., 2016 ; Perez et al., 2018, 2020**).

Flores microbiennes (UFC/g)	Échantillons			
	S	Ι	D	
FTAM	$4.0 \times 10^{4} \pm 1.05^{a}$	$3.3 \times 10^{4} \pm 0.07^{b}$	$2.0 \times 10^{4} \pm 1.00^{\circ}$	
Coliformes totaux	00	00	00	
Coliformes thermotolérants	00	00	00	
Bactéries lactiques	$1.0 \times 10^6 \pm 0.70^a$	$2.7 \times 10^6 \pm 1.27^a$	$1.32 \times 10^7 \pm 0.13^a$	
Staphylocoques	Abs	Abs	Abs	
Clostridium sulfito-réducteurs	00	00	00	
Levures et moisissures	10	00	00	
Flore halophile	2	2	2	
5%	$1.23 \times 10^{3} \pm 0.83^{a}$	$2.40 \times 10^{3} \pm 0.12^{b}$	$2.64 \times 10^{\circ} \pm 0.55^{\circ}$	
10%	$1.12 \times 10^{3} \pm 1.00^{a}$	$1.21 \times 10^{3} \pm 0.05^{b}$	$1.43 \times 10^{3} \pm 0.59^{\circ}$	

Tableau 16. Caractéristiques microbiologiques des échantillons d'anchois salés-mûrs.

S: Echantillon prélevé de la partie superficielle ; I : Echantillon prélevé de la partie intermédiaire ; D : Echantillon prélevé de la partie profonde. UFC: Unité Formant Colonie ; FTAM : Flore Totale Aérobie Mésophile ; Abs: Absence. ^{a-c} Les valeurs sur la même ligne et marquées d'une lettre différente différent significativement (p < 0.01).

III. 5. Caractérisation des isolats halophiles

III. 5.1. Screening des activités hydrolytiques extracellulaires

Un total de 60 isolats bactériens a été obtenu à partir des échantillons d'anchois salés-mûrs, 46 d'entre eux étaient producteurs d'hydrolases extracellulaires dont 6 se sont révélés producteurs de façon concomitante des trois activités ciblés (amylase, cellulase et pectinase) (**Tableau 17-Annexe III**). Ces isolats ont été par la suite sélectionnés pour une identification morphologique, biochimique et moléculaire détaillée. Comme indiqué dans le tableau, ils sont désignés selon un code composé de deux lettres et d'un numéro indiquant l'ordre d'isolement. Un exemple d'hydrolyse est représenté par la figure **6**. L'hydrolyse de l'amidon et de la caséine est prédominante par rapport à celle des autres polymères. L'activité protéolytique quant à elle est dominée par la dégradation de la caséine au détriment de la gélatine. L'hydrolyse de l'huile d'olive et des Tweens 20 et 80 est présente chez un total de 21 isolats.



Figure 6. Exemples de mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires. ^{A)} Hydrolyse de CMC par AC24; ^{B)} Hydrolyse de la pectine par AC3 ; ^{C)} Hydrolyse de l'amidon par AC12.

En outre, un total de 21 isolats possédaient une activité lipolytique et 39 une activité protéolytique (Figure 7-Annexe III). La protéolyse dans le poisson salé est généralement liée à la texture, et au rôle collaboratif des enzymes endogènes du poisson et des enzymes microbiennes dans le processus, où les premières libèrent des peptides qui sont des substrats pour les secondes (Czerner et Yeannes 2014). En général, les premières sont les plus importantes pour modifier la texture et produire une partie de la saveur, tandis que les secondes contribuent au développement de l'arôme et de la saveur (Triqui et Reineccius 1995; Skåra et *al.*, 2015). Il faut prendre en considération qu'un excès de l'une de ces activités à un certain stade du processus pourrait entraîner une perte de qualité ou une altération. Une répartition équilibrée des isolats protéolytiques et lipolytiques durant tout le processus est donc souhaitable (Czerner et Yeannes, 2014). Les isolats protéolytiques étaient généralement non lipolytiques, ce qui pourrait suggérer que la participation d'un consortium bactérien est nécessaire car différentes bactéries contribuent avec des propriétés dissemblables (Perez et *al.*, 2018).

Les activités pectinolytique et cellulolytique se sont avérées modérément présentes chez l'ensemble des isolats avec un effectif de 21 et 14, respectivement. En revanche, uniquement deux isolats ont la capacité d'hydrolyser le xylane.

Il faut noter que 7 isolats ont enregistré une capacité d'hydrolyse intéressante avec une hydrolyse combinée de plus de 4 substrats-tests. 6 d'entre eux ont eu la capacité de produire de façon concomitante, trois polysaccharases différentes (amylase, pectinase et cellulase). Comme déjà mentionné, ces isolats ont été sélectionnés pour une étude détaillée.

Les activités de dégradation des glucides observées dans cette étude pourraient être attribuées aux hydrolases extracellulaires produites par les bactéries entourant les anchois, provenant principalement de l'environnement marin et/ou de la saumure. Elles peuvent également être liées aux habitudes alimentaires des anchois. Cela concerne spécifiquement la teneur en glucides et la composition de l'alimentation. D'après le taux des activités polysaccharases obtenu, la teneur en glucides complexes peut être élevée dans l'alimentation de l'anchois Européen. L'alimentation de ce poisson est à base de zooplanctons dominés par des espèces de copépodes (Bacha et Amara, 2009 ; Jemaa et al., 2016), ces espèces sont donc trop grosses pour être absorbées directement par les bactéries, ce qui nécessite plutôt un clivage hydrolytique en oligo- ou monomères plus petits par les bactéries hétérotrophes qui dépendent largement de l'enzymolyse extracellulaire (Chandrasekaran et Kumar, 2010). Il a été rapporté dans la plupart des environnements aquatiques qu'il existe une relation significative entre les activités des enzymes extracellulaires, leurs substrats correspondants (polymères) et leurs produits d'hydrolyse (monomères) (Münster et al., 1992). Ainsi, la présence de bactéries cellulolytiques et hémicellulolytiques par exemple dans une région particulière et leur absence dans une autre région devraient indiquer la présence d'une matière organique très variée dans chaque région (Khanderparker et al., 2011).

Les principales enzymes marines signalées comprennent les lipases, les protéases, les laccases et les polysaccharases. Les enzymes dégradant les polysaccharides des microbes marins ont attiré l'attention du monde entier en raison de leurs nouvelles applications industrielles. En particulier, les cellulases (Annamalai et *al.*, 2013 ; Chantarasiri, 2015) et les amylases (Chakraborty et *al.*, 2009, 2011 ; El kady et *al.*, 2017).

III. 5.2. Caractérisation morphologique des isolats

Ces isolats forment sur gélose HM des colonies rondes, lisses, plates, de couleur crème ou crème blanchâtre et mucilagineuses et non mucilagineuses, avec des diamètres allant de 1 à 5 mm après 24 h d'incubation à 37°C. L'observation microscopique a permis de révéler des bâtonnets à Gram positif, formant endospores, disposés en paires ou en chaînettes (**Figure 8**).



Figure 8. Morphologie cellulaire et caractéristiques de la paroi cellulaire de deux isolats halophiles après coloration de Gram (grossissement × 100). ^{A)} AC12; ^{B)} AC3.

III. 5.3. Caractérisation physiologique des isolats

Comme tous les isolats peuvent se développer sur un milieu sans sel, ils peuvent être qualifiés d'halotolérants (**Kushner, 1978**). Trois d'entre eux ont toléré des concentrations salines finales allant jusqu'à 15% (p/v) alors que l'isolat AC12 pouvait tolérer jusqu'à 25% (p/v), ce qui permet de les classer comme des halotolérants extrêmes. La température optimale de croissance de l'ensemble des isolats est située dans la gamme 30-40°C (**Tableau 18**). Il s'agit donc de souches mésophiles à légèrement thermotolérantes (**Mégraud, 2011**). L'intervalle de pH permettant la croissance de l'ensemble des isolats se situe entre pH 5 et pH 9, avec un optimum pour la plupart se variant entre 6 et 7. Ce sont donc des neutrophiles tandis que l'isolat AC12 a présenté un optimum plus large révélant ainsi sa nature alcaliphile.

III. 5.4. Caractérisation biochimique des isolats halophiles

Ces isolats sont positifs à la catalase et à la cytochrome-oxydase. Ils sont donc aérobies ou anaérobies facultatifs. Ces capacités sont en relation avec la qualité sensorielle du poisson fermenté, il pourrait s'agir de capacités souhaitables, étant donné qu'elles ont été considérées comme des propriétés fonctionnelles importantes des principales cultures bactériennes de départ pour la fermentation de la viande. L'enzyme catalase catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène, une forme réactive de l'oxygène impliquée dans l'oxydation des acides gras insaturés. De plus, l'activité cytochrome oxydase contribuerait à réduire l'oxygène dans le barrel de fermentation évitant ainsi le rancissement dû à l'excès d'aldéhydes provenant de l'oxydation des acides gras (Talon et Leroy, 2014 ; Perez et *al.*, 2018).

Les monosaccharides, les disaccharides ainsi que les sures-alcools semblent être faiblement assimilés. La capacité de croitre sur le citrate comme unique source de carbone et d'énergie est observée chez les deux isolats AC12 et AC2.

La production de la β -galactosidase, enzyme responsable de la dégradation du lactose, s'est révélée positive chez 3 isolats. Parmi lesquels, un seul isolat est trouvé capable d'oxyder le lactose (**Tableau 18**). Les deux autres isolats sont probablement déficients en β -galactoside-perméase responsable du transport du lactose dans le cytoplasme, comme suggéré par certains auteurs (**Joffin et Leyral, 2006**).

Les résultats de la croissance sur le milieu TSI, ont montré que la fermentation du glucose et l'oxydation du lactose est plus fréquente que l'oxydation du saccharose et l'absence de production de CO_2 et d'H₂S. Aucune production d'indole n'a été détectée. La production de ces deux composés (H₂S et indole) est indésirable en raison de leur implication dans le développement de mauvaises odeurs et l'altération consécutive des produits de poisson salés (Huss et Valdimarsson, 1990).

L'ensemble des isolats possède une tryptophane-désaminase (TDA). AC12 est le seul isolat capable de produire les trois types d'enzymes ADH, LDC et ODC. La production d'acétoïne mise en évidence par les réactifs VPI et VPII s'est révélée plus fréquentes que celle d'acides mixtes. Cependant, 3 isolats ont la capacité d'exécuter les deux types de fermentations.

Caractéristiques	AC1	AC3	AC12	AC22	AC40	AC48
Gram	+	+	+	+	+	+
Forme	Petits bacilles fins	Bacilles fins	Petits bacilles	Petits bacilles fins	Bacilles	Bacilles fins
Mode de regroupement	Isolés et groupés	Isolés et groupés	Isolés et groupés	Isolés et groupés	Isolés et groupés	Isolés et groupés
	en chainettes	en chainettes	en chainettes	en chainettes	en chainettes	en chainettes
Endospores	+	+	+	+	N.O	+
Morphologie des	Ronde plate	Ronde plate	Ronde plate	Ronde plate	Irrégulière	Ronde plate
colonies					élevée	
Pigmentation	Blanc-crème	Crème	Crème	Crème	Blanc-crème	Blanc-crème
Présence de mucilage	Non	Non	Oui	Non	Oui	Oui
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	+	+	+	-
ADH	-	-	+	+	+	-
LDC	-	-	+	-	-	-
ODC	-	-	+	-	-	-
Utilisation de citrate	+	-	+	-	-	-
Production d'indole	-	-	-	-	-	-
Voges Proskaur	+	+	+	-	+	+
Rouge de méthyle	+	-	+	-	-	+
Fermentation de glucose	-	-	-	+	+	-
Oxydation du lactose	-	+	+	-	-	-
Oxydation du saccharose	-	-	+	-	-	-
Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Production de CO ₂	-	-	-	-	-	-
N.O: Non observée ; +: positive	; - : négative.					

 Tableau 18. Caractéristiques morphologique et biochimique des isolats bactériens sélectionnés.

III. Résultats et Discussion

Caractéristiques	AC1	AC3	AC12	AC22	AC40	AC48
Fermentation du mannitol	+	-	+	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	+	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	+	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	+	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Amygdaline	-	-	-	+	-	-
Uréase	-	-	+	-	-	-
Nitrate réductase	-	+	+	-	-	-
Tryptophane Désaminase	+	+	+	+	+	+
(TDA)						
Température	25-60	25-60	20-60	25-55	20-60	20-60
(optimum) (°C)	(40)	(37)	(37)	(40)	(30)	(37)
Concentration de NaCl	0-15	0-10	0-25	0-15	0-10	0-15
(optimum) (%, p/v)	(2.5)	(7.5)	(5)	(2.5)	(2.5)	(2.5)
pH	5-9	6-8	5-10	5-9	5-9	5-9
(optimum)	(7)	(6)	(9)	(7)	(7)	(6)
+: positive ; - : négative.						

Tableau 18. Caractéristiques morphologique et biochimique des isolats bactériens sélectionnés (suite).

III. Résultats et Discussion

Caractéristiques	AC1	AC3	AC12	AC22	AC40	AC48	
Hydrolyse des polymères							
Amidon	+	+	+	+	+	+	
СМС	+	+	+	+	+	+	
Pectine	+	+	+	+	+	+	
Xylane	-	-	-	-	+	+	
Caséine	-	+	+	+	-	+	
Gélatine	+	+	+	+	+	+	
Huile d'olive	+	-	-	+	-	-	
Tween 80	+	-	-	-	-	-	
Tween 20	-	-	-	-	-	-	
+: positive ; - : négative.							

Tableau 18. Caractéristiques morphologique et biochimique des isolats bactériens sélectionnés (suite).

III. 5.5. Caractérisation moléculaire des isolats performants

Les résultats des tests phénotypiques réalisés selon les recommandations de *Bergey's Manual* of Systematic Bacteriology (Logan et De Vos, 2015) ont relevé de nombreuses caractéristiques morphologiques et physiologiques typiques du genre *Bacillus*.

Une analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S a été effectuée pour confirmer l'identité des espèces. Une recherche BLAST sur les séquences primaires de l'ARNr 16S a été effectuée. L'ADN génomique des isolats sélectionnés a été extrait et purifié. Le rendement de l'extraction de l'ADN génomique a varié de 5 à 20 ng/µL (Tableau 19-Annexe III). L'amplification par PCR a produit un fragment d'environ 1500 pb (Figure 9). Le score d'identité maximum avec les séquences génétiques de la base de données de l'ARNr 16S a montré une identité de 100% de AC1 avec les espèces Bacillus albus, B. cereus, B. paranthracis et B. tropicus. La souche AC3 a révélé une identité de 100% avec B. mojavensis, B. safensis, et B. subtilis. AC12 a donné une identité de 100% avec B. flexus. AC22 a donné une identité de 100% avec B. xiamenensis, B. mojavensis, B. halotolerans et B. subtilis. AC40 n'a pas été identifié et AC48 a montré une identité de 100% avec B. subtilis (Tableau 20-Annexe III). Les taux de couverture des séquences requêtes par les alignements sont supérieurs à 94% ce qui traduit une bonne qualité des séquences obtenues (Benson et al., 2018). En comparant les caractéristiques morphologique et biochimique de nos isolats avec celles des souches répertoriées et décrites correspondantes à 100%, AC1 a été classée proche de B. tropicus (Tableau 21-Annexe III), AC3 proche de B. subtilis (Tableau 22-Annexe III) et AC12 a été classée proche de B. flexus et AC22 proche de B. halotolerans (Tableau 23-Annexe III).

Le genre *Bacillus* est devenu une option fiable pour trouver des bactéries nouvelles et prometteuses pour la production de plusieurs enzymes extracellulaires. Différentes espèces de *Bacillus*, notamment *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. stearothermophilus*, produiraient environ 60% des enzymes disponibles dans le commerce (**Burhan et al., 2003**). Un cycle de fermentation court, une capacité à sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire, une manipulation sûre, un comportement respectueux de l'environnement, une manipulation facile pour obtenir des enzymes aux caractéristiques souhaitées, une activité enzymatique élevée dans une large gamme de conditions (pH, température, osmolarité, pression extrêmes, etc.), et une production simple et rentable ont fait de ce genre de bactéries des candidats pour la production d'une variété d'enzymes ainsi que

d'autres produits biochimiques depuis des décennies (Demirkan et al., 2005 ; Deb et al., 2013).



Figure 9. Produits d'amplification PCR du gène d'ARNr 16S des isolats d'intérêt sur gel d'agarose 0.8 % (p/v). ^{M)} Marqueur moléculaire *Gene Ruler* 1 kb.

III.6. Sélection de la souche la plus performante

Sur la base des résultats obtenus lors du screening d'hydrolases extracellulaires et en particulier ceux de l'activité amylolytique, sur 30 bactéries halotolérantes productrices d'amylases extracellulaires, 6 isolats ont montré un indice enzymatique considérable (IE > 1.5) avec le plus important qui a été observée chez la souche *B. flexus* AC12 (**Tableau 24-Annexe III**). Sur la base de ce résultat, elle a été choisie comme souche prometteuse pour des études ultérieures.

III.7. Production d'amylase par Bacillus flexus AC12

Dans ce présent travail, la souche d'intérêt a été utilisée pour la production de l'amylase extracellulaire en culture submergée en utilisant le bouillon LB et en l'incubant à 37°C pendant 48 heures sous une agitation de 150 rpm. Après incubation, le dosage de l'activité amylasique selon la méthode de DNS a donné une valeur de 1.56 UI/mg. Afin de maximiser cette valeur, plusieurs paramètres affectant la sécrétion d'amylase dans le milieu de culture ont été optimisés.

III.7.1. Cinétiques de croissance et de production de l'amylase par Bacillus flexus AC12

La courbe de croissance bactérienne a montré que la souche avait une phase de latence jusqu'à 6 heures, après laquelle une phase exponentielle a été observée après 36 heures d'incubation, suivie d'une phase stationnaire. La production de l'amylase dépendait de la croissance et atteignait son maximum en 72 heures (Figure 10). Chez les halophiles, la production de l'amylase est généralement dépendante de la croissance et commence en phase exponentielle pour atteindre son maximum en phase stationnaire (Kiran et Chandra, 2008; Prakash et *al.*, 2009). Une production d'amylase similaire dépendante de la croissance a été observée dans le cas de *Bacillus* sp. TSCVKK (Kiran et Chandra, 2008), *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 (Prakash et *al.*, 2009), et *Marinobacter* sp. EMB8 (Kumar et Khare, 2015). Dans le cas de *Bacillus* sp. ANT-6, la production maximale a été atteinte après 24 heures d'incubation (Burhan et *al.*, 2003). En revanche, certains rapports de recherche ont montré que la croissance bactérienne et la production d'enzymes atteignent leur maximum pendant la phase de croissance logarithmique (Mageswari et *al.*, 2012; Sahoo et *al.*, 2016).



Figure 10. Cinétiques de croissance bactérienne et de production d'amylase avant optimisation dans un milieu LB additionné de 1% d'amidon à 37°C sous agitation 150 rpm.

III.7.2. Optimisation des conditions de culture pour la production de l'amylase extracellulaire

III.7.2.1. Effet de la durée d'incubation

La production des enzymes par les microorganismes est directement corrélée à la durée d'incubation (Smits et al., 1996). Dans la présente étude, il a été constaté que la quantité d'enzyme libérée augmentait avec le temps d'incubation et atteignait son activité maximale après 72 heures (Figures 10 et 11). Ce résultat est similaire aux résultats obtenus avec B. licheniformis ATCC 12759 (Akcan, 2011b), Bacillus sp. VS04 (Vishnu et al., 2014) et Bacillus sp. NRC22017 (Elmansy et al., 2018). En contradiction, Deb et al. (2013), Abel-Nabey et Farag (2016), et Paul et al. (2017) ont trouvé qu'un temps d'incubation prolongé au-delà de 48 h diminuait la production de l'enzyme de B. amyloliquefaciens P-001, B. licheniformis AH214, et Bacillus sp. MB6, respectivement. Il a été suggéré que la diminution de l'activité amylasique lors d'une période d'incubation prolongée pourrait être due à l'inhibition et à la dénaturation de l'enzyme (Gautam et al., 2002). Cela pourrait également s'expliquer par le fait que les cellules bactériennes pourraient atteindre la phase de déclin et montrer une synthèse d'amylase diminuée (Aiyer, 2005). Dans une autre étude, l'activité enzymatique optimale de l'amylase produite par B. licheniformis 44 MB 82-G a été enregistrée après 96 heures en utilisant le glucose comme source de carbone (Tonkova et al., 1993).



Figure 11. Effet de la durée d'incubation sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu LB additionné de 1% d'amidon à 37°C sous agitation 150 rpm.

III.7.2.2. Effet de la température

La température est un paramètre environnemental très sensible et vital pour la production des amylases qui doit être contrôlé. Ce facteur varie généralement d'un microorganisme à l'autre (**Sivakumar et al., 2011**). Les amylases isolées des espèces du genre *Bacillus* sont produites sur une large gamme de températures. *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. stearothermophilus* sont parmi les espèces les plus couramment utilisées et signalées comme productrices d' α -amylase à des spectres de températures allant de 37°C à 60°C (Mendu et al., 2005). Une large gamme de températures (35-80°C) a été rapportée pour un optimum de croissance et de production d' α -amylase chez les bactéries (Burhan et al., 2003 ; Prakash et al., 2009).

Pour déterminer la température optimale, la production d'amylase a été réalisée aux différentes températures (25 à 60°C). La production d'enzyme a progressivement augmenté avec la température jusqu'à un maximum à 37°C (Figure 12). L'intervalle de production enzymatique optimale était à 35-37°C. Nusrat et Rahman (2007) et Alariya et al. (2013), ont enregistré une température optimale de 37°C et 35°C pour B. amyloliquefaciens et B. subtilis, respectivement, tandis qu'Elmansy et al. (2018) et Darah et al. (2013), ont rapporté une sécrétion maximale d'amylase par Bacillus sp. NRC22017 et B. licheniformis BT5.9 à 45°C et 50°C, successivement. Selon Vidyalakshmi et al. (2009), la température de croissance joue un rôle important non seulement dans la cinétique de la croissance des bactéries mais aussi dans la cinétique de la production des enzymes. Les molécules doivent entrer en collision avant de pouvoir réagir les unes avec les autres. Les atomes doivent être proches les uns des autres pour former des liaisons chimiques. Cette prémisse est à la base d'une théorie qui explique de nombreuses observations concernant la cinétique chimique, y compris les facteurs influençant les vitesses de réaction. En plus de son impact direct sur la constante de vitesse de réaction de l'enzyme, lorsque la température augmente, elle peut provoquer la dénaturation et l'inactivation de l'enzyme (Demirkan et al., 2017).


Figure 12. Effet de la température sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu LB additionné de 1% d'amidon pendant 72 h sous agitation 150 rpm.

III.7.2.3. Effet du pH

Le pH du milieu de croissance figure parmi les paramètres physiques qui ont un impact significatif sur la production d'enzymes. La plupart des études précédentes ont montré une plage de pH optimale se situant entre 6 et 7 pour la croissance des souches bactériennes et la production d'enzymes (Gupta et al., 2003). Ainsi, l'effet du pH sur la sécrétion d'amylase par B. flexus AC12 a été testé sur un spectre de pH s'étalant entre 5 et 10. La libération maximale d'enzyme a été observée à un pH alcalin de 10 (Figure 13). Cela montre clairement la nature alcaliphile de la souche. Notre résultat est conforme à celui rapporté par Wang et al. (2016) dans le cas de l'amylase produite par la souche Bacillus sp. WangLB. Ellaiah et al. (2002) ont déclaré qu'à pH élevé, l'action métabolique de la bactérie peut être supprimée et ainsi inhiber la production d'enzymes. Ceci est en contradiction avec notre résultat et ceux de plusieurs chercheurs qui ont enregistré une production maximale dans des conditions alcalines pour différentes souches de Bacillus sp., à savoir Niyonzima et More (2014) pour B. flexus XJU-1 à pH 11, Deb et al. (2013) pour B. amyloliquefaciens P-001 à pH 9, Mageswari et al. (2012), Dash et al. (2015), Salman et al. (2016), Simair et al. (2017) pour B. barbaricus, B. subtilis BI19, B. subtilis RM16, Bacillus sp. BCC 01-50 à pH 8, respectivement. Par contre, Gangadharan et al. (2006) et Darah et al. (2013) ont relevé une meilleure production à des pH acides, pH 4 pour B. amyloliquefaciens et pH 5 pour B. licheniformis BT5.9, respectivement. L'α-amylase a été aussi produite dans des conditions neutres (pH 6.5-7.5), comme c'est le cas de *B. amyloliquefaciens* (Nusrat et Rahman, 2007) et *Bacillus* sp. NRC12017 (Elkady et *al.*, 2017). Cette similarité de pH optimaux des enzymes produites par les espèces du genre *Bacillus* a été essentiellement attribuée à la similarité génétique des séquences enzymatiques (Anwar et *al.*, 2011). Dans notre cas, les pH neutres et acides ont révélé une faible production d'enzyme. La diminution d'activité de part et d'autre de la valeur optimale s'interprète par le changement d'ionisation des acides aminés du site actif de l'enzyme. Quand les charges des chaînes latérales des acides aminés sont modifiées, pour des pH plus éloignés de la valeur optimale, la structure de l'enzyme est modifiée, et en perdant sa forme, la molécule perd son activité de catalyse. Cette baisse pourrait également être attribuée à l'altération des mécanismes de transport à travers la membrane microbienne qui peut empêcher par la suite la libération de l'enzyme (Hasan et Hameed, 2001).



Figure 13. Effet du pH sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu LB additionné de 1% d'amidon à 37°C durant 72 h sous agitation 150 rpm.

III.7.2.6. Effet de la concentration en sel

Le sel s'est avéré critique car la production d'amylase était sévèrement affectée en son absence. Une production optimale a été observée en présence de 5% (p/v) de NaCl (**Figure 14**). *Bacillus flexus* a produit de l'amylase jusqu'à 25% (p/v) de NaCl, ce qui révèle la nature halophile de l'isolat pour lequel la présence de sel semble être une condition nécessaire à la production d'enzymes. Après, la production d'enzymes a progressivement diminué avec l'augmentation croissante de la concentration de NaCl. Ceci est principalement du à la diminution de la croissance bactérienne suite aux concentrations salines élevées dans le

milieu. Par conséquent, cette baisse a directement influencé la libération de l'enzyme. Dans le but de maximiser la production, les concentrations salines optimales rapportées varient généralement de 5 à 25% (p/v). Certaines études de production d'amylase par des espèces halophiles du genre *Bacillus* ont abouti à des concentrations salines de : 1% pour *B. vallismortis* TD6 (HQ992818) (Suganthi et *al..*, 2015), de 3% pour *B. licheniformis* AH214 (Abel-Nabey et Farag, 2016), de 5.8% pour *B. barbaricus* (Mageswari et *al.*, 2012) et de 10% pour *Bacillus* sp. souche TSCVKK (Kiran et Chandra, 2008).

Plusieurs travaux de recherche ont été menés pour étudier le rôle du sel dans la régulation des structures et des fonctions des enzymes extrêmement/modérément halophiles. Les résultats ont mis en évidence la dépendance spécifique au sel des structures protéiques chez les halophiles. La majorité des études ont montré une perte d'activité enzymatique après élimination du sel. Ces résultats sont bien étayés par des données structurelles (Hutcheon et *al.*, 2005 ; Karan et Khare, 2011 ; Souza et *al.*, 2012). Alors que la protéine est restée principalement dépliée ou enroulée de manière aléatoire dans un milieu dépourvu de sel, le sel augmente l'ellipticité négative et la replie ensuite. Cependant, des écarts par rapport à la tendance générale susmentionnée ne peuvent être exclus. Même en l'absence de sel, la MDH de *Salinibacter ruber* et l'amylase de *Haloarcula hispanica* sont restées complètement actives et structurées (Hutcheon et *al.*, 2005). De même, la glutamate déshydrogénase (GDH) de *Halobacterium salinarum* était catalytiquement active dans des conditions de faible et forte salinités (Ishibashi et *al.*, 2002). La cause précise d'une telle stabilité est inconnue, mais il est possible que la protéine repliée soit structurellement assez rigide pour rester correctement repliée et résister aux environnements non salins (Sinha et Khare, 2014).



Figure 14. Effet de la concentration saline sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu LB aux différentes concentrations de NaCl, additionné de 1% d'amidon à 37°C durant 72 h sous agitation 150 rpm.

III.7.2.4. Effet du volume de l'inoculum

Dans cette présente étude, l'ensemencement du milieu de production a été réalisé par différents volumes d'inoculum (1 à 5%, v/v). Le volume de l'inoculum a une influence très significative (p < 0.01) sur la production d'amylase. La production maximale a été obtenue à une concentration d'inoculum de 2% suivie par une diminution progressive à des volumes d'inoculum plus élevés (Figure 15). Cela peut s'expliquer par le fait qu'une concentration élevée d'inoculum entraîne une croissance bactérienne rapide accompagnée d'un manque considérable des nutriments présents dans le milieu de production afin d'assurer et de surmonter cette croissance. Ainsi, cela réduit dans une grande mesure la croissance bactérienne et augmente l'accumulation des sous-produits, réduisant ainsi la production de l'enzyme. Nos résultats sont en harmonie avec les données publiées par plusieurs chercheurs tels que Niyonzima et More (2014), Dash et al. (2015), Hasan et al. (2017) et Du et al. (2018). Par contre, Pinjari et Kotari (2018) ont relevé une relation linéaire entre le volume de l'inoculum et la production enzymatique. Il convient de noter qu'il n'existe pas de volume précis d'inoculum bactérien adapté à la production d'amylase. À titre d'exemple, il peut varier de 0.2% pour Bacillus sp. NRC2201 (Elmansy et al., 2018), 1% pour B. amyloliquefaciens P-001 (Deb et al., 2013), 4% pour B. cereus SB2 (Raplong et al., 2014), 5% pour B. subtilis souche RM16 (Salman et al., 2016), 10% pour B. subtilis souche JPBW-9 et Bacillus sp. souche RU1 (Anwar et *al.*, 2011 ; Pinjari et Kotari, 2018) à 20% pour *Bacillus* sp. (Saxena et Singh, 2011).



Figure 15. Effet du volume de l'inoculum sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu LB à 5% de NaCl, additionné de 1% d'amidon à 37°C durant 72 h sous agitation 150 rpm.

III.7.2.5. Effet de la vitesse d'agitation

La technologie d'agitation des fermenteurs industriels est critique pour la production d'enzymes car elle doit assurer des conditions optimales en termes de transfert d'oxygène et d'homogénéisation des concentrations en substrats, tout en respectant une double contrainte: limiter la consommation énergétique et minimiser l'impact mécanique du cisaillement sur les micro-organismes (Hardy et al., 2017). Afin de vérifier l'impact de la vitesse d'agitation sur la production d'amylase, la souche *B. flexus* a été cultivée dans des conditions optimisées, en variant les vitesses d'agitation de statique à 250 rpm. La production d'enzyme a atteint son maximum à 100 rpm, après laquelle la sécrétion de l'amylase a commencé à diminuer progressivement (Figure 16). Cette diminution pourrait être attribuée à la lyse des cellules suite aux conditions d'agitation les plus élevées. Nos résultats se concordent à ceux obtenus par Darah et al. (2013) pour *B. licheniformis* BT59. En se basant sur les données de la littérature, les espèces du genre *Bacillus* sont connus à produire un maximum d'enzyme sous un intervalle de vitesses d'agitation allant de 120 à 160 rpm (Gupta et al., 2003 ; Deb et al., 2013 ; Dash et al., 2015; Abel-Nabey et Farag, 2016 ; Hasan et al., 2017). Les effets de la vitesse d'agitation et de la concentration de l'inoculum sur la

production d'amylase ont été moins étudiés chez les bactéries halophiles. **Amoozegar et al.** (2003) ont constaté qu'*Halobacillus* sp. Produisait un maximum d'amylase sous une vitesse d'agitation de 200 rpm.





III.7.2.7. Effet des ions métalliques

Une gamme de sels (CaCl₂, KCl, NaCl, MnSO₄ et HgSO₄) à une concentration de 0.01% (p/v) a été testée pour voir leurs effets sur la production d'amylase. Le CaCl₂ s'est avéré être le meilleur pour la production d'amylase (**Figure 17**). Des résultats similaires ont été enregistrés chez *Bacillus* sp. souche TSCVKK (**Kiran et Chandra, 2008**) et *Chromohalobacter* sp. TVSP 101 (**Prakash et al., 2009**). Dans la présente étude, le KCl et le NaCl ont également amélioré la production mais avec un taux plus faible. Il faut noter que l'effet du KCl sur la production était meilleur que celui du NaCl. Selon des résultats antérieurs, MgSO₄.2H₂O en combinaison avec K₂HPO₄ s'est avéré être le meilleur pour la production d'amylase par *Marinobacter* sp. EMB8 (**Kumar et Khare, 2015**) alors que la production par *Halobacillus* sp. souche MA-2 était maximale en présence de Na₃AsO₄ (**Amoozegar et al., 2003**).



Figure 17. Effet des ions métalliques sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu de production (6) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm.

III.7.2.8. Effet des sources de carbone

Afin de déterminer l'influence de différentes sources de carbone sur la production d'amylase, la fermentation en Erlenmeyer a été réalisée en fixant les conditions optimales et en substituant uniquement la source de carbone du milieu de base. Différentes sources de carbone sous forme de monosaccharides ou de polysaccharides ont été ajoutées individuellement à une concentration de 1% (p/v) afin de déterminer leur effet sur la synthèse d'amylase par B. flexus AC12. La production la plus élevée a été obtenue avec l'amidon, le xylose, la dextrine et le saccharose, indiquant une expression inductive, alors que le sorbitol était le moins approprié pour la production enzymatique (Figure 18). La production d'amylase a eu lieu en présence ou en absence d'amidon, avec d'autres sucres. Ce même résultat a été rapporté par Deb et al. (2013) et Elmansy et al. (2018). La production d'amylase chez les halophiles est généralement inductible et nécessite des inducteurs appropriés tels que l'amidon et la dextrine, comme c'est le cas de Marinobacter sp. EMB8 en utilisant l'amidon comme meilleur inducteur (Kumar et Khare, 2015) et d'Halobacillus sp. souche MA-2 en donnant un maximum de production en présence de dextrine. Il a été également constaté que l'amidon était la meilleure source de carbone utilisée par plusieurs espèces de Bacillus pour produire de l'amylase (Gangadharan et al., 2006 ; Suganthi et al., 2015 ; Elkady et al., 2017 ; Hasan et al., 2017). Même si l'amidon est le substrat préféré pour la production d'amylase dans la plupart des Bacillus sp., les sucres simples tels que le glucose (Salva et Moraes, 1995), le fructose (Pinjari et Kotari, 2018), le maltose (Sivakumar et *al.*, 2011 ; Elmansy et *al.*, 2018) et le lactose (Vijayan et *al.*, 2015) ont permis d'obtenir plus de production. En général, la synthèse des enzymes dégradant les glucides dans la plupart des espèces du genre *Bacillus* est soumise à une répression catabolique par des substrats facilement métabolisables comme le glucose (Akcan, 2011a ; Pinjari et Kotari, 2018). Rao et Sathyanarayana (2003) ont signalé que les différentes sources de carbone ont une influence variée sur les enzymes extracellulaires, en particulier sur les souches productrices d'amylase.



Figure 18. Effet des sources de carbone sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu de production (2) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm.

• Effet de la concentration de la source de carbone (amidon)

L'amidon est ubiquitaire et constitue une source d'énergie facilement accessible (**Ryan et** *al.*, **2006**). Une gamme de concentrations du substrat (amidon) allant de 1% à 7% (p/v) a été sélectionnée pour étudier leur influence sur la sécrétion d'amylase par la souche extrêmement halotolérante *B. flexus* AC12. Un maximum de production (19.99 UI/mg) a été obtenu en utilisant une concentration de substrat de 5%, après cette concentration, une diminution a été observée (Figure 19). Kumar et Khare (2015) ont enregistré une même concentration maximale de substrat exigée par la souche halophile modérée *Marinobacter* sp. EMB8. Niyonzima et More (2014) ont signalé une augmentation de 8.25 fois de l'activité

amylolytique avec 1.5% d'amidon soluble chez *B. flexus* XJU-1. **Mishra et Behera (2008)** et **Elmansy et al. (2018)** ont observé que la production d' α -amylase par des souches du genre *Bacillus* a atteint son pic à une concentration d'amidon de 2%, tandis que **Tiwari et al. (2014)** ont rapporté une concentration optimale de 4% et qu'au-dessus de cette concentration, la production d'enzyme a légèrement diminué. Cette baisse est attribuée d'une part à la consommation rapide de l'amidon conduisant à la libération de déchets métaboliques toxiques qui suppriment la croissance des bactéries et la production d' α -amylase. Et d'autre part, à la viscosité du bouillon causée par des concentrations élevées d'amidon, ce qui interfère par conséquent avec le transfert d'O₂ et entraîne une diminution de la concentration en oxygène dissout nécessaire à la croissance microbienne (**Elmansy et al., 2018**).



Figure 19. Effet de la concentration de substrat sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu de production (2) aux différentes concentrations d'amidon à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm.

• Effet des sources alternatives de carbone (Déchets de cuisine)

Afin de produire de l'amylase en utilisant des déchets de cuisine organiques comme source de carbone, nous avons utilisé le milieu (2) contenant 2% de différents déchets de cuisine amylacés. Six déchets de cuisine : les pelures de trois légumes, pommes de terre, carottes et courgettes, et trois fruits, melon, banane et mandarine, ont été évalués individuellement et sous forme de mélange, ce qui a donné lieu à 7 milieux différents. Nos résultats ont révélé une production maximale de 19.99 UI/mg avec les pelures de carottes, de bananes et de mandarines, suivie par le mélange (**Figure 20**). L'analyse statistique a montré qu'il y a une

différence hautement significative (p < 0.01) dans la production d'amylase entre le milieu basal et le milieu organique des déchets de cuisine.

L'utilisation de matières premières facilement disponibles est considérée comme économique pour la production commerciale d'enzymes de valeur par le processus de fermentation. L'utilisation de différents déchets est considérée comme une pratique courante à cet égard car ces déchets sont une bonne source de carbone nécessaire à la croissance microbienne (Azad et *al.*, 2013 ; Deb et *al.*, 2013 ; Hasan et *al.*, 2017). Selon nos résultats, *B. flexus* AC12 a montré une bonne capacité de dégradation des déchets organiques de cuisine, exposant ainsi son utilisation prometteuse pour produire une amylase extracellulaire à partir d'un milieu à faible coût à l'échelle industrielle. Awasthi et *al.* (2017) et An et *al.* (2018) ont également rapporté que *Bacillus* spp. est une bactérie à croissance rapide qui possède de fortes enzymes extracellulaires qui montrent différents effets sur l'hydrolyse des composés organiques et la décomposition des déchets alimentaires facilitée par ses activités enzymatiques.



Figure 20. Effet des sources alternatives de carbone sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu de production (3) à base de déchets de cuisine (2%) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm.

III.7.2.9. Effet des sources d'azote

Dans l'étude actuelle, une variété de sources d'azote (organiques, inorganiques et acides aminés) a été ajoutée au milieu de production dans le but de vérifier leur impact sur la production d'amylase.

III.7.2.9.1. Effet des sources d'azote organique

Parmi les différentes sources d'azote organique utilisées, l'extrait de levure a donné la plus grande productivité de l'enzyme (19.59 UI/mg) (Figure 21). Ceci est probablement en raison de sa teneur élevée en minéraux, vitamines, coenzymes et composants azotés (Roses et Guerra, 2009). Plusieurs chercheurs ont relevé le même constat (Kumar et al., 2012 ; Sharma et al., 2012 ; Vishnu et al., 2014 ; Abel-Nabey et Farag, 2016) alors que d'autres ont révélé une production élevée en présence de diverses autres sources à savoir la peptone dans le cas de *Bacillus* sp. (Hasan et al., 2017), la tryptone dans le cas de *Chromohalobacter* sp. TVSP101 (Prakash et al., 2009) et *B. amyloliquefaciens* P-001 (Deb et al., 2013), la caséine dans le cas de *B. subtilis* IP 5832 (Bozíc et al., 2011) et *Marinobacter* sp. EMB8 (Kumar et Khare, 2015), l'extrait de levure plus extrait de viande dans le cas de *Bacillus* sp. NRC22017 (Elmansy et al., 2018), l'extrait de levure et tryptone dans le cas de *Bacillus* sp. sp. souche TSCVKK (Kiran et Chandra, 2008) et l'extrait de levure plus peptone dans le cas de *Bacillus* sp. (Teodoro et Martins, 2000).



Figure 21. Effet des sources d'azote organique sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu de production (**4**) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm.

III.7.2.9.2. Effet des sources d'azote inorganique

En ce qui concerne les sources d'azote inorganique, $Ca(NO_3)_2$ était la meilleure source d'azote pour la sécrétion d'amylase, suivie par NaNO3 et KNO3 (Figure 22). Dans ce présent travail, la libération d'amylase a été plus stimulée par les sources d'azote inorganique que par les sources organiques. Ce résultat est en accord avec celui constaté par Deb et al. (2013). Il a été observé qu'un certain nombre de sources d'azote inorganique comme les ions ammonium et les ions nitrate ont un impact stimulant élevé sur la production d'amylase, comme le nitrate d'ammonium (Deb et al., 2013), le nitrate de sodium (Suganthi et al., 2015), le chlorure d'ammonium (Das et al., 2004) et le carbonate d'ammonium (Pinjari et Kotari, 2018). Le rôle de l'ion calcium dans la stabilité et l'activité catalytique de l' α amylase était un sujet de recherche depuis des années. La présence de l'ion calcium dans les milieux de fermentation était stimulante car elle augmentait le rendement de libération de l'amylase ; cela correspondait bien aux rapports précédents déterminant la capacité du Ca²⁺ à améliorer la stabilité et l'activité de l'amylase chez les espèces de Bacillus (Unakal et al., 2012). Par rapport au chlorure, le nitrate a fourni également une meilleure stabilisation de l'amylase en raison de sa géométrie plane et triangulaire, qui lui permet de bien pénétrer dans le site actif de l'α-amylase (Saha et al., 2014).



Figure 22. Effet des sources d'azote inorganique sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu de production (**4**) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm.

III.7.2.9.3. Effet des acides aminés

En parallèle, différents acides aminés ont été testés (**Figure 23**). La production maximale a été obtenue lorsque le milieu a été supplémenté avec de la L-histidine. Une bonne production a également été enregistrée avec la L-glutamine, la glycine et le L-aspartate. La L-arginine s'est avérée être la moins appropriée pour la production de l'enzyme. **Vengadaramana et al.** (2012) ont trouvé la productivité enzymatique la plus élevée en présence de tryptophane, tandis que **Suganthi et al.** (2015) ont signalé que l'ajout de L-phényl alanine entraînait une production maximale d'amylase. Ainsi, aucune source d'azote unique ne peut être qualifiée d'universellement bonne (**Kumar et al., 2016**). Une teneur plus faible ou plus élevée en azote peut inhiber la production d'enzymes (**Sharma et al., 2012**).



Figure 23. Effet des acides aminés sur la production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 dans un milieu de production (5) à 37°C durant 72 h sous agitation 100 rpm.

III.8. Cinétiques de croissance et de production d'amylase par *Bacillus flexus* AC12 après optimisation

La production d'amylase par *B. flexus* AC12 a été étudiée dans des conditions de culture optimisées dans un milieu (7) contenant (g/L) : amidon, 50 ; extrait de levure, 15 ; xylose, 10 ; NaCl, 50, CaCl₂, 10 ; ajusté à pH 10 et ensemencé avec un volume d'inoculum de 2% (v/v). L'incubation est réalisée à 37 °C pendant 90 h et sous une agitation de 100 rpm.

Par rapport à l'activité initiale, l'optimisation du milieu a permis une augmentation très significative (p < 0.01) de la production en la multipliant par un facteur de 12.86 (**Figure 24**). Ce niveau de production optimisée d'amylase semble être cohérent avec celui rapporté par **Kumar et Khare (2015)** chez la bactérie halophile modérée *Marinobacter* sp. EMB8.





III.9. Purification partielle de l'enzyme brute extracellulaire

L'enzyme a été partiellement purifiée par ultrafiltrations suivies par une précipitation au sulfate d'ammonium 70% (p/v). Les résultats sont résumés dans le tableau **25**. L'amylase extracellulaire a présenté des valeurs d'activité spécifique croissantes à chaque niveau de purification, conduisant à un facteur de purification de 2.63.

Une α -amylase halophile produite par la souche halophile modérée *Nesterenkonia* sp. souche F a été purifiée jusqu'à homogénéité par précipitation dans l'éthanol à 80%, échange d'anions sur Q-Sepharose et chromatographie par filtration sur gel de Sephacryl S-200. L'amylase purifiée a présenté une activité spécifique de 357 UI/mg, un facteur de purification de 21.4 et un rendement de 2% (**Shafiei et al., 2011**). En outre, la purification de l' α -amylase extracellulaire de l'espèce *Bacillus subtilis* KIBGE HAS a été réalisée par ultrafiltration, précipitation au sulfate d'ammonium à 40% et chromatographie par filtration sur gel.

L'enzyme a été purifiée jusqu'à homogénéité avec un facteur de purification de 96.3 et une activité spécifique de 13011 UI/mg (**Bano et** *al.*, **2011**).

Etape de	Protéines	Activité	Activité	Rendement	Facteur de
purification	totales (mg)	totale (UI)	spécifique	(%)	purification
			(UI/mg)		
Surnageant	275.5 ± 5.76	148.77 ± 4.89	0.54	100	1
Ultrafiltration	161 ± 0.98	137.44 ± 4.12	0.85	92.38	1.57
MWCO 10 kDa					
Ultrafiltration	92 ± 0.78	104.88 ± 3.87	1.14	70.50	2.11
MWCO 30 kDa					
Précipitation à	46 ± 1.05	65.32 ± 0.57	1.42	43.91	2.63
70% (p/v) de					
(NH4)2SO4					

Tableau 25. Résultats des étapes de la purification partielle de l'enzyme.

III.10. Détermination du poids moléculaire par SDS-PAGE et zymographie de l'enzyme

Après purification partielle, l'enzyme a été soumise à une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et zymographie en présence d'amidon. D'après les résultats de l'analyse des deux gels, le poids moléculaire de la protéine active sur gel de zymographie a été déterminé après comparaison de la position de la bande protéique avec les protéines marqueurs sur le gel de polyacrylamide. La masse moléculaire a été estimée à environ 85 kDa (**Figure 25**). En général, le poids moléculaire des amylases de *Bacillus* sp. a été rapporté comme étant compris entre 12.2 et 160 kDa (**Mehta et Satyanarayana, 2016 ; Febriani et** *al.*, **2019**).



Figure 25. Résultats de la SDS-PAGE et du zymogramme de l'amylase produite par *B. flexus* AC12. ^{M)} Marqueurs protéiques ; ¹⁾ Enzyme partiellement purifiée ; ²⁾ Hydrolyse du substrat dans le gel.

III.11. Caractérisation de l'enzyme partiellement purifiée

III.11.1. Effet de la température sur l'activité et la stabilité

Les activités amylolytiques ont été testées sur une large gamme de températures comprises entre 4°C et 100°C. L'enzyme a montré son maximum d'activité à 55°C (**Tableau 26**) et s'est révélée stable et active sur toute la gamme testée, conservant $87.44 \pm 0.8\%$ et $60.45 \pm 0.8\%$ de son activité à 20°C et 90°C, respectivement, ce qui révèle son caractère thermotolérant. Des rapports de recherche précédents ont indiqué que les amylases du genre *Bacillus* étaient caractérisées par leur thermostabilité ainsi que leur activité sur une large gamme de températures (37-70°C) (**Saxena et Singh, 2011 ; Deb et** *al.*, **2013 ; Abel-Nabey et Farag, 2016 ; Simair et** *al.*, **2017**).

La plupart des études se concentrent sur la purification et la caractérisation des α -amylases thermostables sécrétées par les bactéries, mais pas par les champignons et les levures. Généralement, les bactéries thermophiles sont les plus couramment utilisées comme producteurs d' α -amylase car elles peuvent survivre à haute température et produire des enzymes dont la température optimale est supérieure à 50°C (**Lim et al., 2020**). Les enzymes thermostables ne sont pas désactivées par le chauffage du mélange à une certaine température pendant une certaine période en raison de leur température de dénaturation élevée, contrairement aux enzymes mésophiles (**Straathof et Adlercreutz, 2014**). La stabilité à haute température des protéines halophiles s'est avérée être régulée par la présence de sel. La β -lactamase de *Chromohalobacter* sp. halophile a conservé ~82% de son activité après un traitement thermique à 100°C pendant 5 min (**Tokunaga et al., 2004**). Cela indique une « renaturation réversible » de la lactamase induite par le sel.

Une nouvelle α -amylase a été découverte chez la souche *Bacillus licheniformis* B4-423, présentant une activité optimale à 100°C et à pH 5. L'enzyme était stable sur une large gamme de température (4 à 100°C) et présente une activité supérieure à 90% de 20°C à 80°C (**Wu et al., 2018**). En raison de ces propriétés favorables, l'enzyme thermostable a été appliquée dans de nombreux processus de production tels que le brassage et la fermentation du vin, la boulangerie et la transformation des aliments, l'industrie de la pâte et du papier et les systèmes de traitement des détergents.

La thermostabilité est cruciale dans les applications industrielles, car la plupart des processus sont réalisés de manière optimale à température élevée. Les enzymes thermostables peuvent être stockées à température ambiante, ce qui réduit les coûts d'où leur efficacité et leur valeur économique (**Straathof et Adlercreutz, 2014 ; Zhang et** *al.*, **2017**).

III.11.2. Effet du pH sur l'activité et la stabilité

Le pH optimal pour l'activité amylasique a également été déterminé sur un large spectre de pH (4-11). L'activité maximale a été observée à pH 9 (**Tableau 26**). L'enzyme a également montré une activité à pH 10 et pH 11. En plus des conditions acides et alcalines, la préparation enzymatique était également active dans des conditions neutres, ce qui facilite son utilisation éventuelle dans les formulations de détergents, le traitement des jus et des fruits, la boulangerie et la brasserie. Les amylases sont connues d'être actives sur une large gamme de pH (4-11) (**Saxena et Singh, 2011**). L'enzyme a également montré une bonne stabilité sur l'intervalle de pH allant de 5 à 10 en gardant un pourcentage d'activité allant de 59.81 ± 6.1% à $62.09 \pm 3.4\%$, respectivement, ce qui traduit son caractère alcalitolérant. Il s'agit d'une caractéristique très importante pour son utilisation éventuelle dans les formulations de détergents. De nombreux articles de recherche ont rapporté que les souches de *Bacillus* productrices d'amylase présentent un pH optimal d'activité enzymatique dans la gamme de pH 6-10 (**Deb et al., 2013 ; Suganthi at al., 2015 ; Hasan et al., 2017 ; Pinjari et Kotari, 2018**).

III.11.3. Effet de la concentration en sel sur l'activité et la stabilité

La concentration saline influence significativement l'activité et la stabilité enzymatiques. L'enzyme était très active sur une large gamme de concentrations de NaCl (0-25%, p/v) avec une activité optimale à 10% (p/v) de NaCl (**Tableau 26**). De même, l'α-amylase de *Thalassobacillus* sp. LY18 était très stable sur une large gamme de concentrations de NaCl (0-20%, p/v) (**Li et Yu, 2012**). L'enzyme a également conservé 143.61 ± 5.4 % et 112.13 ± 2.2 % de son activité après 1 h d'incubation à 10 et 12.5 % (p/v) de NaCl, respectivement. Cependant, dans cette étude, même en l'absence de NaCl dans le mélange réactionnel, une activité amylasique a pu être détectée (66.96 ± 13.5 %). À 25% de NaCl, l'enzyme a conservé 92.64 ± 3.5 % de son activité. Il est intéressant de noter que l'enzyme était stable sur toute la gamme de concentrations salines testée. Ces résultats traduisent clairement la nature halophile de l'enzyme. **Kiran et Chandra (2008)** ont observé que l'α-amylase halophile de *Bacillus* sp. TSCVKK était stable sur un spectre allant de 2 à 15% (p/v) de NaCl. La plupart des enzymes halophiles rapportées dans la littérature sont inactivées lorsque la concentration de NaCl diminue à moins de 12% (**Madern et** *al.***, 2000**).

Le sel est essentiel pour maintenir la structure native des protéines halophiles. Des preuves expérimentales suffisantes concluent que le sel contribue de manière significative à la modulation de la structure/activité des protéines dans différentes conditions chaotropiques. L'effet protecteur induit par le sel sur la structure contre les agents chaotropiques, la température et les solvants ainsi que les transitions structurelles correspondantes établissent un lien structure-fonction unique dans les enzymes halophiles. La compréhension de leur comportement différentiel et de leur stabilité dans des conditions plus difficiles pourrait conduire à une meilleure compréhension des caractéristiques biochimiques et biophysiques de ces protéines et à leur exploitation pour des applications en biocatalyse ou en biotransformation dans des conditions salines ou de faible teneur en eau (Sinha et Khare, 2014).

Conditions du mélange	Activité relative (%)	Activité résiduelle après				
réactionnel		1 h d'incubation (%)				
pH						
4	72.25 ± 0.6	28.40 ± 1.7				
5	93.78 ± 23.4	59.85 ± 6.1				
6	96.14 ± 4.4	61.72 ± 8.6				
7	96.35 ± 6.6	63.63 ± 8.6				
8	97.42 ± 6.6	64.46 ± 1.3				
9	100.00 ± 5.7	68.38 ± 6.8				
10	97.85 ± 0.9	62.09 ± 3.4				
11	92.92 ± 1.4	57.58 ± 10.8				
Température (°C)						
4	42.40 ± 7.0	74.14 ± 16.9				
20	75.00 ± 6.6	87.44 ± 0.8				
25	76.47 ± 7.9	101.72 ± 3.0				
30	76.72 ± 2.8	164.11 ± 9.4				
37	78.19 ± 5.4	98.50 ± 13.9				
40	81.37 ± 10.8	82.65 ± 5.5				
45	83.33 ± 4.0	82.65 ± 10.5				
50	87.25 ± 6.2	80.05 ± 4.9				
55	100.00 ± 13.6	78.43 ± 7.6				
60	85.78 ± 2.5	76.76 ± 2.1				
70	81.62 ± 3.4	70.98 ± 1.2				
80	80.64 ± 0.9	69.03 ± 5.5				
90	80.15 ± 0.2	60.45 ± 0.8				
100	76.72 ± 4.5	41.65 ± 4.9				
С	Concentration saline (%, p/v)					
0	67.22 ± 5.2	66.96 ±13.5				
1	70.45 ± 6.9	68.64 ± 3.3				
2.5	71.80 ± 0.6	95.5 ± 11.9				
5	72.53 ± 1.4	99.54 ± 5.2				
7.5	99.06 ± 14.3	102.18 ± 4.7				
10	100.00 ±15.3	143.61 ± 5.4				
12.5	80.33 ± 2.1	112.13 ± 2.2				
15	80.02 ± 0.1	105.4 ± 0.6				
20	69.41 ± 0.8	93.09 ± 5.6				
25	67.43 ± 2.6	92.64 ± 3.5				

Tableau 26. Effet des conditions du mélange réactionnel, température, pH et concentration saline, sur l'activité et la stabilité de l'amylase.

III.11.4. Effet du temps de réaction

En ce qui concerne le temps de réaction optimal, le dosage de l'enzyme a été effectué aux différents temps de réaction allant de 5 à 30 minutes aux conditions optimales de température (55°C) et de pH (9). Il a été observé que l'enzyme présentait son pic d'activité après 15 min de réaction (**Figure 26**). **Deb et** *al.* (2013) et **Hasan et** *al.* (2017) ont enregistré un temps de réaction optimal de 40 min et 20 min, respectivement.



Figure 26. Effet du temps de réaction sur l'activité amylasique.

III.11.5. Effet des ions métalliques sur l'activité et la stabilité

L'influence de divers ions métalliques à savoir NaCl, KCl, LiCl, CaCl₂, CuCl₂, NiCl₂, MgSO₄, FeSO₄, ZnSO₄, AgNO₃, MoNa₂O₄, et HASNa₂ a été mesurée à une concentration finale de 10 mM dans les conditions optimales de réaction.

L'activité enzymatique a été significativement augmentée d'environ 54%, 46%, et 28% après incubation de l'enzyme en présence d'une concentration de 10 mM de FeSO₄, KCl, et ZnSO₄, respectivement (**Tableau 27**). Cependant, Mg²⁺, Ni²⁺ et As³⁻ ont également montré une légère augmentation de l'activité enzymatique, tandis que Li⁺, Cu²⁺, Ag⁺ et Mo²⁺ ont inhibé l'activité à différents degrés. L'inhibition par ces métaux peut être attribuée à leur liaison aux résidus catalytiques du site actif de l'enzyme (**Shafei et al., 2012**). Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par certains travaux dans la littérature. Par exemple, l'amylase de *B. amyloliquefaciens* TSWK1-1 était inhibée par Cu²⁺ (**Kikani et Singh, 2011 ; Wang et al., 2016**). Cependant, **Emtenani et al. (2015**) ont constaté que l'activité de l'amylase produite

par B. subtilis DR8806 était stimulée par les ions K⁺ et Na⁺. La stimulation de l'activité enzymatique par les ions F^{2+} , Zn^{2+} et K^+ est expliqué par le fait que ces ions ont probablement joué le rôle de cofacteurs de cette enzyme (Sahoo et al., 2016). L'ajout de Ca²⁺ n'a presque pas eu d'effet sur l'activité amylasique, ce qui traduit que l'amylase produite par la souche B. flexus AC12 est Ca2+-indépendante. Dans la littérature, de nombreuses amylases de Bacillus sp. ont été signalées comme étant Ca²⁺-dépendantes; l'ajout de Ca²⁺ a eu des effets significatifs sur l'activité amylasique (Abdel-Fattah et al., 2013; Emtenani et al., 2015). Cependant, l'un des principaux problèmes de l'industrie amidonnière liés à la dépendance aux ions calcium est la formation d'oxalate de calcium, une substance qui peut bloquer les tuyaux de traitement et les échangeurs de chaleur. Par conséquent, la demande en amylase indépendante du calcium a fait l'objet d'une attention croissante ces dernières années (Kikani et Singh, 2011; Xie et al., 2014), ce qui implique que l'amylase produite par B. flexus AC12 présente un potentiel d'utilisation dans l'industrie de l'amidon. L'enzyme semble être plus stable en présence de 10 mM de KCl et de CaCl₂, conservant respectivement 140.17% et 113.75% de son activité initiale. Ces résultats suggèrent que, bien que le Ca2+ stabilise l'enzyme, il n'est pas nécessaire à l'activité enzymatique. Ce résultat est cohérent avec celui obtenu par Shafei et al. (2012).

III.11.6. Effet des détergents et des surfactants sur l'activité et la stabilité

L'activité amylasique a été estimée en présence de 10 mM de détergents tels que le Triton X-100 et le Tween 80 et de tensioactifs tels que le SDS, le PMSF et le PEG 6000.

Le PMSF n'a eu aucun effet significatif sur l'activité enzymatique. Cela signifie que les résidus de sérine et les liaisons disulfure ne sont pas essentiels pour l'activité enzymatique (**Shafiei et al., 2010**). Le Triton X-100 et le Tween 80 n'ont pas non plus affecté l'activité de l'amylase. Afin d'avoir des applications dans les industries de détergents, l'amylase doit être stable dans divers ingrédients de détergents, tels que les surfactants et les chélateurs (**Arikan, 2008**). L'enzyme a gardé 80% de son activité lorsqu'elle a été incubée pendant 1h avec du Tween 80 alors qu'en présence de Triton X-100 elle a conservé complètement son activité (**Tableau 27**). Par conséquent, cette amylase peut être utile dans les industries de détergents. Ce genre de stabilité a été également rapporté par l' α -amylase halophile produite par *Bacillus* sp. TSCVKK, qui a donné une bonne stabilité en présence de 0.1% de surfactants non-ioniques (**Kiran et Chandra, 2008**). Le SDS s'est avéré être un inhibiteur fort comme dans le cas de *B. thermoleovorans* causant une inhibition presque complète de l'activité enzymatique (**Tanaka et Hoshino, 2002**). La cause de la forte inhibition par le SDS pourrait être due aux

changements de la conformation locale dans le site actif de la molécule d'enzyme ce qui entraîne une inhibition, un dépliage partiel réversible et une inactivation ultérieure (Sahoo et *al.*, 2016).

Agent chimique	Activité relative (%)	Activité résiduelle (%)
		après 1h d'incubation
MoNa ₂ O ₄	65.00 ± 4.17	75.38 ± 1.70
CuCl ₂	76.82 ± 6.08	86.39 ± 1.20
ZnSO ₄	128.18 ± 0.85	100.00 ± 2.90
AgNO ₃	70.00 ± 19.30	82.47 ± 3.32
MgSO ₄	119.55 ± 0.64	111.03 ± 1.98
LiCl	84.09 ± 3.75	101.62 ± 2.90
NiCl ₂	113.18 ± 2.97	108.84 ± 0.71
HAsNa ₂	112.27 ± 7.14	105.30 ± 1.98
FeSO ₄	153.64 ± 0.71	91.72 ± 3.18
NaCl	104.09 ± 1.77	86.92 ± 6.58
KCl	145.91 ± 2.12	140.17 ± 0.07
CaCl ₂	109.09 ± 3.82	113.75 ± 1.48
Tween 80	108.64 ± 4.60	80.80 ± 2.62
Triton X-100	103.64 ± 0.92	105.60 ± 1.77
PMSF	107.27 ± 1.77	104.64 ± 0.57
PEG 6000	72.27 ± 7.14	44.53 ± 10.32
SDS	40.91 ± 1.06	32.22 ± 7.07

Tableau 27. Valeurs moyennes de l'activité amylasique relative et résiduelle en présence de différents agents chimiques.

PMSF: PhenylMethylSulfonylFluoride; PEG: PolyEthyleneGlycol; SDS: Sodium Dodecyl Sulfate.

III.11.7. Effet des solvants organiques sur l'activité et la stabilité

La stabilité enzymatique a été estimée en présence d'une concentration de 10% de divers solvants tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone, le chloroforme, le glycérol, l'isoproponal et le DMSO.

L'activité de l'amylase produite par *B. flexus* AC12 a également été testée en utilisant une concentration de 10% de différents solvants (**Tableau 28**). Un effet inhibiteur a été relevé pour tous les solvants organiques testés. Le maximum d'activité et de stabilité a été obtenu en présence de 10% (v/v) d'éthanol. Dans cette étude, le chloroforme a montré l'effet inhibiteur le plus puissant sur l'activité amylasique. Des résultats similaires ont été rapportés dans le cas de *Halorubrum xinjiangense* (**Moshfegh et al., 2013**). Au contraire, les amylases de *Nesterenkonia* sp. souche F et de *Haloterrigena turkmenica* (**Shafiei et al., 2010 ; Santorelli**

et *al.*, **2016**) ont montré une augmentation de l'activité. Le chloroforme et l'acétone se sont également avérés inhibiteurs pour *B. cereus* OCW3 (1) (**Dhundale, 2015**). En outre, l'acétone, l'isopropanol et l'éthanol ont été trouvés stimulateurs pour l'activité amylasique de plusieurs espèces du genre *Bacillus* (**Vihinen et Mantsala, 1990**; **Abdel-Fattah et** *al.*, **2013**). Tandis que le méthanol a été rapporté comme inhibiteur par **Tiwari et** *al.* (2014).

Solvant organique	Activité relative (%)	Activité résiduelle (%) après
		1 h d'incubation
Ethanol	61.82 ± 6.50	58.33 ± 0.00
Méthanol	12.73 ± 2.33	17.50 ± 2.05
Isopropanol	32.73 ± 3.32	27.50 ± 1.63
Glycérol	07.27 ± 3.11	08.78 ± 1.20
Acétone	29.70 ± 1.84	12.04 ± 5.23
Chloroforme	04.85 ± 0.14	09.52 ± 0.92
DMSO	03.64 ± 0.64	09.02 ± 4.81

Tableau 28. Valeurs moyennes de l'activité amylasique relative et résiduelle en présence de différents solvants organiques.

DMSO: DiMethylSulfOxide.

III.11.8. Détermination de la spécificité au substrat

La spécificité au substrat a été vérifiée en présence des solutions 1% (p/v) de différents types de substrats tels que l'amidon, la pectine, la carboxyméthylcellulose (CMC), le xylane, l'arabinane, le β -glucane, l'arabinoxylane de blé, le xylane de bois de hêtre. Les substrats d'amidon brut utilisés étaient la paille de riz et les pelures de carottes, de mandarines et de bananes.

Il a été observé que la spécificité était maximale envers l'amidon, suivi par le xylane de bois de hêtre et la pectine (**Figure 27**). Ces résultats indiquent que l'enzyme a une affinité plus élevée envers les substrats de poids moléculaire élevé contenant des liaisons α -1,4 et α -1,6. **Gupta et al. (2003)** ont également obtenu une affinité maximale de l'amylase pour l'amidon, l'amylose et l'amylopectine. Des variations ont été rapportées entre différentes souches en ce qui concerne la spécificité au substrat (**Mohamed et al., 2011**). En 1998, **Igarashi et al.** ont rapporté que l' α -amylase d'un isolat alcaliphile du genre *Bacillus* avait une hydrolyse maximale de l'amylopectine (144%), de l'amidon soluble (100%), du glycogène (37%) et de la dextrine (7%). Au contraire, la souche sauvage de *B. amyloliquifaciens* a été trouvée active

vers les substrats de faible poids moléculaire alors que sa souche mutante a été trouvée plus active sur les substrats contenant à la fois des liaisons α -1,4 et α -1,6 (**Demikran, 2011**). Néanmoins, l' α -amylase s'est avérée capable d'hydrolyser directement l'amidon brut des pelures de mandarines et de carottes.



Figure 27. Spécificité de l'amylase aux différents substrats.

III.11.9. Détermination de la stabilité au stockage

La stabilité au stockage de l'enzyme est une caractéristique importante des enzymes à usage industriel. Pour déterminer la stabilité enzymatique au stockage, des aliquotes d'enzyme ont été stockées pendant 10 jours aux différentes températures (-18°C, 4°C et 25 ± 2 °C). Lors du stockage à 25°C, une diminution progressive de l'activité enzymatique a été observée où l'activité la plus faible a été constatée après 10 jours, tandis qu'à -18°C, l'enzyme a perdu totalement son activité après 10 jours. La diminution et la perte de l'activité enzymatique pourraient être corrélées à la congélation et à la décongélation des échantillons qui ont finalement entraîné la dénaturation des protéines. En revanche, à 4°C, l'enzyme a conservé son activité à 43% après 10 jours (**Figure 28**). Il a également été observé que l'enzyme présentait une stabilité maximale à 25°C par rapport aux autres températures testées ce qui confirme son caractère thermotolérant. Nos résultats sont en accord avec ceux de **Nisha et al.** (**2013**), qui ont rapporté qu'une amylase purifiée de *B. cereus* MTCC 10205 était plus stable à

4°C qu'à 35°C. Seule une perte de 10% de l'activité enzymatique originale a été observée après 5 jours de stockage alors qu'une perte de 28% de l'activité enzymatique a été constatée à 35°C en 3 jours.



Figure 28. Stabilité de l'amylase au stockage.

III.12. Production de l'amylase par deux types de fermentation en présence des substrats d'amidon brut

La production d'amylase sous fermentations en milieu solide (SSF) et submergée (SmF) a également été vérifiée en utilisant de la paille de riz comme déchet agricole et un mélange de pelures de mandarines, de carottes et de bananes comme déchets de cuisine. Une augmentation et une différence significatives de la production d'amylase a été observée sous SSF par rapport à SmF. Le mélange de pelures s'est avéré être le substrat le plus approprié pour la production d'enzyme par les deux méthodes. Il a été constaté que *B. flexus* AC12 a un potentiel d'hydrolyse des formes naturelles et commerciales d'amidon. Les titres d'unités d'amylase étaient plus élevés sous SSF que sous SmF (**Figure 29**). L'activité amylasique était environ deux fois plus élevée en utilisant les pelures de mélange comme source d'amidon naturel.

Les enzymes importantes pour l'industrie, y compris les amylases, ont traditionnellement été obtenues à partir de cultures submergées en raison de la facilité de manipulation. La SSF

constitue une alternative intéressante car les métabolites ainsi produits sont concentrés et les procédures de purification sont moins coûteuses (**Soni et al., 2003**). La souche a montré une activité maximale le $3^{\text{ème}}$ jour de fermentation. La production dans tous les milieux a augmenté jusqu'au troisième jour, où l'activité enzymatique était maximale, puis elle a diminué considérablement jusqu'au sixième jour. Ceci est en harmonie avec les rapports précédents d'un certain nombre de chercheurs qui ont obtenu une production d' α -amylase par fermentation à l'état solide à des températures allant de 37°C à 60°C en utilisant des espèces appartenant au genre *Bacillus* (**Mendu et al., 2005 ; Saha et al., 2014**).



Figure 29. Production fermentaire d'amylase sous fermentations SmF et SSF.

III.13. Applications industrielles possibles de l'amylase produite par *Bacillus flexus* AC12

Compte tenu des nombreuses applications des enzymes microbiennes dans divers secteurs industriels, l'amylase produite par *B. flexus* AC12 a été étudiée pour une éventuelle utilisation dans différents processus industriels.

III.13.1. Clarification du jus de pomme

Une clarification du jus de pomme jusqu'à 32% et 18% a été observée après 4 heures d'incubation avec l'enzyme à 55°C et 25°C, respectivement (**Figure 30**). La quantité de sucres réducteurs a augmenté de manière très significative (p < 0.01) à 10 µmol et 7.75 µmol après 4 heures d'incubation du jus avec l'enzyme par rapport au jus de pomme non traité.

Ceci contribue à l'augmentation du goût sucré du jus. Nos résultats sont en concordance avec ceux de **Kothari et al. (2013)** qui ont rapporté une clarification du jus de pomme jusqu'à 30% après 4 heures d'incubation avec un mélange d'enzymes (pectinase et cellulase) et une augmentation de la quantité de sucres réducteurs de 20 μ g/mL. Le mélange d'enzymes a donné jusqu'à 50% de clarification du jus. Le jus de pomme traité avec une enzyme individuelle en laboratoire a présenté 15-30% d'élimination de la turbidité alors que le traitement par mélange d'enzymes élimine 40-50% de la turbidité dans l'expérimentation globale. Dans cette étude, l'enzyme individuelle a montré une efficacité maximale de la clarification du jus de pomme à 55°C à pH 5.



SR: Sucres Réducteurs.

Figure 30. Effet de l'enzyme sur la clarification et le taux des sucres réducteurs du jus de pomme.

III.13.2. Compatibilité de l'amylase avec les détergents de commerce

Sept marques de détergents disponibles localement en Espagne (Ariel, Marsella, Vernel, Pronto, Aro, Limón, Lejía) ont été utilisées pour déterminer leur compatibilité avec les propriétés détergentes de l'amylase produite par *Bacillus flexus* AC12 dans des conditions optimales d'activité.

L'utilisation d'enzymes dans les industries de détergents est une pratique courante dans le monde. Récemment, plus de la moitié de tous les types de détergents contiennent une petite quantité d'enzymes comme la lipase, la cellulase et l'amylase. Pour une éventuelle utilisation commerciale de l'amylase dans les industries des détergents, l'enzyme a été traitée (à 55°C,

pH 9) par six détergents liquides couramment utilisés pour vérifier sa compatibilité avec les détergents. L'amylase a montré une compatibilité maximale avec Ariel (113.94%), Pronto (112.12%) et Vernel (92.12%) (Figure 31). Rehman (2019) a également signalé une activité et stabilité extrêmes en présence du détergent à lessive Ariel à haute température (60-65°C). En outre, Hammami et *al.* (2018) ont démontré que la préparation amylolytique alcaline de *B. mojavensis* SA était extrêmement stable vis-à-vis de la poudre Shames et Dixan testée à 30°C et conservait 100% de son activité initiale. Après 1 h d'incubation à 40 et 50°C en présence du détergent Shames, plus de 87% et 40% de l'activité ont été conservés, respectivement. En ce qui concerne les détergents liquides, l'activité était moins stable et elle a perdu entre 55% et 77% de son activité après une 1 h incubation à 50°C.



Figure 31. Compatibilité de l'amylase avec les détergents de commerce.

Conclusion

L'intérêt porté aux bactéries halophiles et halotolérantes a abouti à la découverte d'une diversité inouïe, complètement inattendue, d'enzymes dotés de propriétés singulières qui ont très vite attiré l'attention des biotechnologues. C'est dans cette perspective que s'inscrit cette étude, qui s'est focalisée d'une part sur l'étude de plusieurs critères de qualité d'un poisson salé selon une méthode traditionnelle connu d'être trop consommé en Méditerranée: l'anchois Européen (*Engraulis encrasicolus*) et d'autre part sur la caractérisation et l'appréciation du potentiel biotechnologique d'une amylase extracellulaire produite par une bactérie halo-alcalitolérante isolée à partir des échantillons d'anchois salés-mûrs.

En termes de qualité organoleptique, l'acceptabilité globale du poisson, mesurée sur une échelle de qualité à 8 points a révélé un produit semi-mûr. Les échantillons d'anchois salésmûrs présentaient également une faible teneur en protéines, des niveaux élevés de cendres et de sel et une grande variation de la teneur en lipides. D'autre part, il y avait une corrélation évidente entre les niveaux de profondeur d'où les échantillons ont été collectés et le profil des acides gras polyinsaturés. Les teneurs en acides gras essentiels étaient plus élevées dans les anchois prélevés des couches superficielles et profondes. Ce genre de corrélation pourrait constituer une information très utile pour initier une étude approfondie sur cette thématique.

Un milieu de culture spécifique aux halophiles (HM) à deux concentrations salines finales, 5 % et 10 % (p/v) a servi à l'isolement, la purification et la caractérisation des isolats. Les isolats pures sont caractérisés phénotypiquement puis soumis à une recherche qualitative de 6 hydrolases extracellulaires (amylase, cellulase, pectinase, xylanase, protéase et lipase). La production combinée des trois activités polysaccharidiques amylase, cellulase et pectinase était choisi comme un critère d'importance pour sélectionner les isolats performants.

Un total de 60 isolats bactériens a été isolé à partir d'échantillons d'anchois salés-mûrs. Parmi nos isolats, 46 étaient producteurs d'hydrolases extracellulaires. L'hydrolyse de l'amidon et de la caséine est prédominante par rapport à celle des autres polymères-test. Il faut noter que des activités hydrolytiques combinées sont observées chez 40 isolats dont 6 se sont révélés être producteurs de façon concomitante des trois hydrolases ciblés (amylase, pectinase et cellulase). Ces isolats sont par la suite sélectionnés pour une caractérisation morphologique, biochimique et moléculaire détaillée.

Les isolats d'intérêt se présentent sous forme de bâtonnets à Gram positif avec la présence d'endospores. Ces bactéries sont aérobies ou anaérobies facultatives halotolérantes, mésophiles à légèrement thermotolérantes et neutrophiles à l'exception de l'isolat AC12 qui

s'est révélé être une bactérie halotolérante extrême et possédant une nature alcaliphile. Le séquençage et l'analyse des gènes de l'ARNr 16S ont révélé que les bactéries halotolérantes choisies appartenaient au genre *Bacillus*. Les souches sélectionnées étaient capables de produire jusqu'à cinq activités hydrolytiques différentes ce qui traduit leur véritable atout biotechnologique.

À la lumière des résultats obtenus lors du screening de l'activité amylolytique, la souche *Bacillus flexus* AC12 a donné l'indice enzymatique le plus important. Sur la base de ce résultat, elle a été choisie comme la souche la plus performante pour continuer l'étude d'une part de l'impact de différents facteurs physiques et nutritionnels sur le rendement de production de l'amylase d'intérêt et d'autre part sa caractérisation, sa production et son application pour une éventuelle utilisation en industrie.

L'optimisation des conditions de culture de la souche *Bacillus flexus* AC12 a relevé une production dépendante de la croissance atteignant son maximum en phase stationnaire après 72 heures de fermentation en utilisant un volume d'inoculum de 2%, à pH 10 et en incubant à 37°C sous une vitesse d'agitation de 100 rpm.

Le sel s'est avéré critique car la production d'amylase était sévèrement affectée en l'absence de sel. Un maximum de production est observé en présence de 5% (p/v) de NaCl avec une sécrétion amylasique continue jusqu'à 25% (p/v) de NaCl. La production est améliorée en présence de chlorure de calcium (CaCl₂).

Parmi les sources de carbone utilisées, l'amidon est considéré comme le meilleur inducteur permettant une meilleure production à 5 (%, p/v) de concentration. D'autres sources de carbone alternatives représentées par des déchets de cuisine à base de pelures de fruits et légumes ont été également utilisées pour formuler un milieu de culture à faible coût. Une production maximale est observée en présence de pelures de carottes, de bananes et de mandarines. Selon nos résultats, la souche *Bacillus flexus* AC12 a montré une bonne capacité de dégradation des déchets organiques à faible coût, exposant ainsi son utilisation prometteuse pour une éventuelle production d'amylase extracellulaire à grande échelle. En parallèle, parmi les différentes sources d'azote testées, l'azote inorganique sous forme de Ca(NO₃)₂ semble être le meilleur pour avoir une plus grande productivité de l'enzyme.

L'enzyme partiellement purifiée avec un poids moléculaire estimé à environ 85 kDa présente un maximum d'activité à 55°C avec un large spectre de thermostabilité s'étalant entre 20°C et 90°C, son pH optimum est de 9. En plus des conditions acides et alcalines, la préparation enzymatique était également active dans des conditions neutres et stables sur un intervalle important de pH allant de 6 à 10 ce qui ouvre des opportunités de son utilisation dans plusieurs secteurs industriels à savoir les formulations de détergents, le traitement des jus et des fruits, la boulangerie et la brasserie. L'enzyme était active et stable sur une large gamme de concentrations salines (0-25%, p/v) avec un maximum obtenu à 10% (p/v) de NaCl. Ces résultats traduisent clairement que cette enzyme thermostable est halo-alcalitolérante.

L'amylase produite par la souche *Bacillus flexus* AC12 est Ca⁺²-indépendante, stimulée par les ions Fe⁺², K⁺ et Zn⁺², inhibée par les solvants organiques et le SDS et stable en présence de Tween 80 et Triton X-100. La spécificité au substrat était maximale envers l'amidon.

La production d'amylase sous deux types de fermentations (SSF) et (SmF) en utilisant la paille de riz comme déchet agricole et un mélange de pelures de mandarines, de carottes et de bananes comme déchets de cuisine a permis d'avoir un rendement plus important sous SSF en présence de déchets de cuisine.

Vue la stabilité étendue que présentait l'amylase produite par la souche halo-alcalitolérante *Bacillus flexus* AC12 sur un large spectre de pH, l'enzyme a été étudiée pour des éventuelles utilisations en clarification de jus de pomme et en formulation des détergents. La clarification du jus de pomme a donné un résultat encourageant de 32% d'efficacité à 55°C et à pH 5. Les propriétés détergentes de l'enzyme à pH 9 étaient compatibles avec celles des lessives liquides de marques Ariel et Pronto.

Du point de vue biotechnologique, les propriétés intéressantes de l'amylase, révélées au cours de cette étude, nous encourage par la suite à :

- ✓ Réaliser une caractérisation plus poussée par une purification complète, une étude structurale et biochimique en calculant ses paramètres cinétiques K_m et V_{max}.
- ✓ Lancer une tentative de sa production à l'échelle pilote sous conditions optimales en utilisant le milieu de culture à base de déchets de cuisine déjà formulé afin d'envisager une future exploitation à l'échelle industrielle.
- Réaliser un clonage et une surexpression des gènes afin de créer des espèces nouvelles capables de produire industriellement de grandes quantités d'amylases recombinées, thermostables et halo-alcalitolérantes.
- Enfin, élargir le spectre des applications en se concentrant plus particulièrement sur le domaine de la biotechnologie alimentaire.

Références

bibliographiques

Aakre, I., Bøkevoll, A., Chaira, J., Bouthir, F.Z., Frantzen, S., Kausland, A., & Kjellevold, M. (2020). Variation in nutrient composition of seafood from North West Africa: Implications for food and nutrition security. *Foods*, 9(10), 1-17. DOI: 10.3390/foods9101516.
Ababouch, L., & El-Marrakchi, A. (2009). Elaboration des semi-conserves d'anchois ; aspect économique, techniques et hygiéniques. FAO Document technique sur les pêches et l'aquaculture, 525, pp.1-90.

Abdel-Fattah, Y.R., Soliman, N.A., El-Toukhy, N.M., El-Gendhi, H., & Ahmed, R.S. (2013). Production, purification, and characterization of thermostable α-amylase by *Bacillus licheniformis* isolate AI20. *Journal of Chemistry*, 1-11. DOI: 10.1155/2013/673173.

Abdu Al-Zazaee, M.M., Neelgund, S., Gurumurthy, D.M., & Rajeshwara, A.N. (2011). Identification, characterization of novel halophilic *Bacillus Cereus* Ms6: A Source for extracellular α-amylase. *Advances in Environmental Biology*, 5(5), 992-999.

Abel-Nabey, H.M., & Farag, A.M. (2016). Production, optimization and characterization of extracellular amylase from halophilic *Bacillus lichineformis* AH214. *African Journal of Biotechnoogy*, 15(17), 670-683. DOI: 10.5897/AJB2015.15073.

Adetitun, D.O. (2020). Different approaches to the Biodegradation of Hydrocarbons in halophilic and Non-halophilic Environments. In *Abia A.L.K., & Lanza, G.R. (Eds.), Current Microbiological Research in Africa, Selected Applications for Sustainable Environmental Management*. Springer Nature Switzerland AG, pp. 313-331. DOI:10.1007/978-3-030-35296-7_12.

Adrian, J., Potus, J., Poiffatt, A., & Dauvillier, P. (1998). Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires. Ed. Lavoisier, Tec & Doc, Paris, pp.1-254.

Afandi, I., Talba, S., Benhra, A., Benbrahim, S., Chfiri, R., Labonne, M., Masski, H., Laë, R., De Morais, L.T., Bekkali, M., & Bouthir, F.Z. (2018). Trace metal distribution in pelagic fish species from the north-west African coast (Morocco). *International Aquatic Research*, 10(2), 191-205. DOI: 10.1007/s40071-018-0192-7.

Ahmed, E.O., Ali, M.E., & Hamed, A.A. (2010). Quality changes of salted Kass (*Hydrocynus forskalii*) during storage at ambient temperature $(37 \pm 1^{\circ}C)$. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(9), 877-881. DOI: 10.3923/pjn.2010.877.881.

Aiyer, P.V., & Modi, H.A. (2005). Isolation and screening of alkaline amylase producing bacterial *Bacillus licehniformis* SPT-27. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*, 7, 895-897.

Akcan, N. (2011a). High level production of extracellular β-galactosidase from *Bacillus licheniformis* ATCC 12759 in submerged fermentation. *African Journal of Microbiology Research*, 5(26), 4615-4621. DOI: 10.5897/AJMR11.716.

Akcan, N. (2011b). High level production of extracellular α -amylase from *B. licheniformis* ATCC 12759 in submerged fermentation. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6), 6833-6840.

Akmoussi-Toumi, S., Khemili-Talbi, S., Kebbouche-Gana, S., Lenchi-Izouine, N., Khelfaoui, M.A., Sayah, A., Bouarab, G., Ferrioune, I., Mokhtari, W., & Najjari, A. (2019). Diversity of culturable halophilic *Archaea* and *Bacteria* from chott Tinsilt and El Malah salt-lake in Algeria. *Current Research in Bioinformatics*, 8(1), 46-54. DOI: 10.3844/ajbsp.2019.46.54.

Akpolat, C., Ventosa, A., Birbir, M., Sánchez-Porro, C., & Caglayan, P. (2015). Molecular identification of moderately halophilic bacteria and extremely halophilic archaea isolated from salted sheep skins containing red and yellow discolorations. *Journal of the American Leather Chemists Association*, 110(7), 211-220.

Alariya, S.S., Sethi, S., Gupta, S., & Gupta, B.L. (2013). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil. *Archives of applied science research*, 5(1), 15-24.

Albo-Puigserver, M., Muóz, A., Navarro, J., Coll, M., Pethybridge, H., Sánchez, S., & Palomera, I. (2017). Ecological energetics of forage fish from the Mediterranean 579 Sea: Seasonal dynamics and interspecific differences. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 140, 74-82. DOI: 10.1016/j.dsr2.2017.03.002.

Ali, I., Akbar, A., Yanwisetpakdee, B., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., & Punnapayak, H. (2014). Purification, characterization, and potential of saline waste water remediation of a polyextremophilic α-amylase from an obligate halophilic *Aspergillus gracilis*. *BioMed Research International*, 2014, 1-7. DOI: 10.1155/2014/106937.

Ali, I., Akbar, A., Anwar, M., Prasongsuk, S., Lotrakul, P., & Punnapayak, H. (2015). Purification and characterization of a polyextremophilic α-amylase from an obligate halophilic *Aspergillus penicillioides* isolate and its potential for souse with detergents. *BioMed Research International*, 2015, 1-8. DOI: 10.1155/2015/245649.

Aliat, T., Kaabeche, M., Khomri, H., Nouri, L., Neffar, S., & Chenchouni, H. (2016). A pedological characterisation of some inland wetlands and Ramsar sites in Algeria. *Land Degradation and Development*, 27(3), 693-705. DOI: 10.1002/ldr.2467.

Alsaban, W.A., Abou-El-Hawa, S.H., Hassan, M.A.M., & Abd EL-Rahman, M.A. (2014). Effect of salting and storage on chemical composition of some fish species. *Journal of* 123 *Food and Dairy Sciences, Mansoura University*, 5(6), 451-458. DOI: 10.21608/jfds.2014.53003.

Amanullah, A., Blair, R., Nienow, A.W., & Thomas, C.R. (1999). Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(4), 434-446. DOI: 10.1002/(sici)1097-0290(19990220)62:4<434::aid-bit6>3.0.co;2-d.

Amid, M., Manap, M.Y.A., & Zohdi, N. (2014). Optimization of processing parameters for extraction of amylase enzyme from dragon (*Hylocereus polyrhizus*) peel using response surface methodology. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-12. DOI: 10.1155/2014/640949.

Ammara-Addou, N., Schumann, P., Spröer, C., Ben Hania, W., Hacene, H., Fauque, G., Cayol, J.L., & Fardeau, M.L. (2015). *Melghiribacillus thermohalophilus* gen. nov., sp. nov., a novel filamentous, endospore-forming, thermophilic and halophilic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(4), 1172-1179. DOI: 10.1155/2014/640949.

Amoozegar, M.A., Malekzadeh, F., & Malik, K.A. (2003). Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *Journal of Microbiological Methods*, 52(3), 353-359. DOI: 10.1016/s0167-7012(02)00191-4.

Amoozegar, M.A., Safarpour, A., Noghabi, K.A., Bakhtiary, T., & Ventosa, A. (2019). Halophiles and their vast potential in biofuel production. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1-40. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01895.

An, B., Park, M.K., & Oh, J.H. (2018). Food waste treatment using *Bacillus* species isolated from food wastes and production of air-dried *Bacillus* cell starters. *Environmental Engineering Research*, 23(3), 258-264. DOI: 10.4491/eer.2017.116.

Andrei, A.Ş., Banciu, H.L., & Oren, A. (2012). Living with salt: metabolic and phylogenetic diversity of archaea inhabiting saline ecosystems. *FEMS Microbiology Letters*, 330(1), 1-9. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02526.x.

Annamalai, N., Rajeswari, M.V., Elayaraja, S., & Balasubramanian, T. (2013). Thermostable, haloalkaline cellulase from *Bacillus halodurans* CAS 1 by conversion of lignocellulosic wastes. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 409-415. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.01.066.

Anwar, T., Mathur, A., Mathur, G., & Chauhan, R.S. (2011). Statistical optimization for coproduction and partial characterization of thermohalotolerant lipase and amylase from halotolerant *Bacillus subtilis* JPBW-9. *World journal of science and technology*, 1, 54-63.
AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1990). *Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists.* 15th Ed. Washington, DC.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1995). Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16th Ed. Gaithersburg, M.D, USA.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1996). *Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists.* 4th Ed. Washington D.C.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists (2000). Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 17th Ed. Gaithersburg, M.D, USA.

AOCS. (1993). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, AOC Press. Washington, DC.

Aponte, M., Blaiotta, G., Francesca, N., & Moschetti, G. (2010). Could halophilic archaea improve the traditional salted anchovies *(Engraulis encrasicholus L.)* safety and quality? *Letters in Applied Microbiology*, 51(6), 697-703. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2010.02956.x.

Ariech, M., & Guechi, A. (2015). Assessment of four different methods for selecting biosurfactant producing extremely halophilic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 14(21), 1764-1772. DOI: 10.5897/AJB2015.14611.

Arikan, B. (2008). Highly thermostable, thermophilic, alkaline, SDS and chelator resistant amylase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolate A3-15. *Bioresource Technology*, 99(8), 3071-3076. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.06.019.

Arrignon, J. (1966). L'anchois (*Engraulis Encrasicolus*) des cotes d'Oranie. Revue des travaux de l'Institut des pèches maritimes (0035-2276) (ISTPM), 30(4), 317-342.

Ashraf, M.A., Arshad, M.I., Rahman, S., & Khan, A. (2018). Characterization of moderately thermostable α-amylase-producing *Bacillus licheniformis* from decaying potatoes and sweet potatoes. *BioResources* 13(3), 4931-4945. DOI: 10.15376/biores.13.3.4931-4945.

Asoodeh, A., Chamani, J., & Lagzian, M. (2010). A novel thermostable, acidophilic, αamylase from a new thermophilic *Bacillus* sp. Ferdowsicous isolated from Ferdows hot mineral spring in Iran: Purification and biochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 46(3), 289-297. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2010.01.013.

Averhoff, B., & Müller, V. (2010). Exploring research frontiers in microbiology: Recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. *Research in Microbiology*, 161(6), 506-514. DOI: 10.1016/j.resmic.2010.05.006.

Awasthi, M.K., Selvam, A., Lai, K.M., & Wong, J.W. (2017). Critical evaluation of postconsumption food waste composting employing thermophilic bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 245, 665-672. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.014. **Ayad, R., Idoui, T., Ouled Haddar, H., & Valenzuela, S. (2021).** Depth effect on quality characteristics of traditional salted-ripened anchovy (*Engraulis encrasicolus*) taken from different parts of the same barrel. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 13(4), 62-76. DOI: 10.34302/crpjfst/2021.13.4.6.

Aygan, A., Arikan, B., Korkmaz, H., Dinçer, S., & Çolak, Ö. (2008). Highly thermostable and alkaline α-amylase from a halotolerant-alkaliphilic *Bacillus* sp. AB68. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 547-553. DOI: 10.1590/S1517-838220080003000027.

Azad, A.K., Nahar, A., Hasan, M.M., Islam, K., Azim, M.F., Hossain, M.S., Rahman, M.R., Ojha, R.K., Mahmud, G.M.S., & Kayes, R. (2013). Fermentation of municipal solid wastes by bacterial isolates for production of raw protein degrading proteases. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environmental Science*, 15(2), 365-374.

Azad, M.A., Bae, J.H., Kim, J.S., Lim, J.K., Song, K.S., Shin, B.S., & Kim, H.R. (2009). Isolation and characterization of a novel thermostable α-amylase from Korean pine seeds. *New Biotechnology*, 26(3-4), 143-149. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.09.006.

Bacha, M., & Amara, R. (2009). Spatial, temporal and ontogenetic variation in diet of anchovy (*Engraulis encrasicolus*) on the Algerian coast (SW Mediterranean). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 85(2), 257-264. DOI: 10.1016/j.ecss.2009.08.009.

Bacha, M., & Amara, R. (2012). Inter-cohort differences in growth, condition and feeding of juvenile anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Gulf of Béjaia (Algerian coast, SW Mediterranean): implications for recruitment success. *Fisheries Research*, 129-130, 73-81. DOI: 10.1016/j.fishres.2012.06.012.

Baker, B.J., de Anda, V., Seitz, K.W., Dombrowski, N., Santoro, A.E. & Lloyd, K.G. (2020). Diversity, ecology and evolution of *Archaea*. *Nature Microbiology*, 5(7), 887-900. DOI: 10.1038/s41564-020-0715-z.

Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, S.K.S., Muniraj, I., & Uthandi, S. (2021). Optimization and scale-up of α-amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnology*, 21(1), 1-11. DOI: 10.1186/s12896-021-00686-7.

Balkan, B., Balkan, S., & Ertan, F. (2011). Optimization of parameters for α-amylase production under solid state fermentation by *Trichothecium roseum*. *Romanian Biotechnology Letters*, 16(5), 6591-6600.

Baltas, N., Dincer, B., Ekinci, A.P., Kolayli, S., & Adiguzel, A. (2016). Purification and characterization of extracellular α-amylase from a thermophilic *Anoxybacillus thermarum* A4

strain. Brazilian Archives of Biology and Technology, 59, 1-14. DOI: 10.1590/1678-4324-2016160346.

Bandyopadhyay, A.K., Islam, R.N.UI., Mitra, D., Banerjee, S., Yasmeen, S., & Goswami, A. (2019). Insights from the salt bridge analysis of malate dehydrogenase from *H. salinarum* and *E.coli. Bioinformation*, 15(2), 95-103. DOI: 10.6026/97320630015095.

Bano, S., Qader, S.A.Ul., Aman, A., Syed, M.N., & Azhar, A. (2011). Purification and characterization of novel α-amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS. *An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 12(1), 255-261. DOI: 10.1208/s12249-011-9586-1.

Barat, J., Rodríguez-Barona, S., Andrés, A. & Fito, P. (2003). Cod salting manufacturing analysis. *Food Research International*, 36(5), 447-453. DOI: 10.1016/S0963-9969(02)00178-3.

Barat, J.M., Gallart-Jornet, L., Andrés, A., Akse, L., Carleho, G.M., & Skjerdal, O.T. (2006). Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages. *Journal of Food Engineering*, 73(1), 9-19. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2004.12.023.

Bayir, A., Haliloğlu, H., Sirkecioğlu, A.N., & Aras, N.M. (2006). Fatty acid composition in some selected marine fish species living in Turkish waters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(1), 163-168. DOI: 10.1002/jsfa.2295.

Bellagha, S., Sahli, A., Farhat, A., Kechaou, N. & Glenza, A. (2007). Studies on salting and drying of sardine (*Sardinella aurita*): Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 947-952. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.12.008.

Ben Mohamed, S., Mendes, R., Ben Slama, R., Oliveira, P., Alves Silva, H., & Bakhrouf, A. (2016). Changes in bacterial counts and biogenic amines during the ripening of salted anchovy (*Engraulis encrasicholus*). *Journal of Food and Nutrition Research*, 4(5), 318-326. DOI: 10.12691/jfnr-4-5-8.

Benmebarek, H., Escuder-Rodríguez, J.J., González-Siso, M.I., & Kharroub, K. (2020). Test for the production and assay of the proteolytic activities of halophilic *Bacteria* and *Archaea* isolated from Algerian hypersaline environments. *Proceedings*, 66(1), 1-12. DOI: 10.3390/ECM2020-07118.

Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J., Ouellette, B., Rapp, B.A., & Wheeler, D.L. (1999). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 12-17. DOI: 10.1093/nar/27.1.12.

Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K.D., & Sayers, E.W. (2018). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D41-D47. DOI: 10.1093/nar/gkx1094.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., & Stryer, L. (2015). The purification of proteins is an essential first step in understanding their function. In *Biochemistry*. 5th Ed. WH Freeman, New York.1515p.

Berkel, B.M.V., Boogaard, B.V.D., & Heijnen, C. (2005). La conservation du poisson et de la viande. 2^{ème} Ed. Agromisa, Wageningen, Pays-Bas, pp.1-90.

Besteiro, I., Rodríguez, C.J., Tilve-Jar, C., & Pascual, C. (2000). Selection of attributes for the sensory evaluation of anchovies during the ripening process. *Journal of Sensory Studies*, 15(1), 65-77. DOI: 10.1111/J.1745-459X.2000.TB00410.X.

Betty, A.F., Daniel, L.S., & Weissfeld, A.S. (2007). Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 12th Ed. Missouri, Mo: Mosby Elsevier. 1031p.

Bjørkevoll, I., Lauritzsen, K., Gundersen, B., Dahl, R.W., Eilertsen, G., Sivertsen, A.H., Gildberg, A., Marine, N., Thorarinsdottir, K.A., Arason, S., Jónsdóttir, R., Matís A., Hellevik, A.H., & Rønneberg, N. (2008). Ripening of Salted Cod. Nofima marine. Tromsø, Norway, pp.1-49.

Boocharoen, A., Visessanguan, W., Kuncharoen, N., Yiamsombut, S., Santiyanont, P., Mhuantong, W., Charoensri, S., Rojsitthisak, P., & Tanasupawat, S. (2019). *Lentibacillus lipolyticus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from shrimp paste (*Ka-pi*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(11), 3529-3536. DOI: 10.1099/ijsem.0.003658.

Bozíc, N., Ruiz, J., Lopez-Santin, J., & Vujcic, Z. (2011). Optimization of the growth and α -amylase production of *Bacillus subtilis* IP 5832 in shake flask and laboratory fermenter batch cultures. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 76(7), 965-972. DOI: 10.2298/JSC101010098B.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1-2), 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Bragger, J., Daniel, R.M., Coolbear T., & Morgan, H.W. (1989). Very stable enzymes from extremely thermophilic archaebacteria and eubacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 31(5-6), 556-561. DOI: 10.1007/BF00270794.

Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from

128

an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, 38(10), 1397-1403. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00037-2.

Burki, F., Roger, A.J., Brown, M.W., & Simpson, S.G.B. (2020). The new tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 35(1), 43-55. DOI: 10.1016/j.tree.2019.08.008.

Calder, P.C. (2018). Very long-chain n-3 fatty acids and human health: fact, fiction and the future. *Proceedings of the Nutrition Society*, 77(1), 52-72. DOI: 10.1017/S0029665117003950.

Carrín, M. (2004). Characterization of starch in apple juice and its degradation by amylases. *Food Chemistry*, 87(2), 173-178. DOI: 10.1016/j.foodchem.2003.10.032.

Castelle, C.J., & Banfield, J.F. (2018). Major new microbial groups expand diversity and alter our understanding of the tree of life. *Cell*, 172(6), 1181-1197. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.016.

Castillo-Carvajal, L.C., Sanz-Martín, J.L., & Barragán-Huerta, B.E. (2014). Biodegradation of organic pollutants in saline wastewater by halophilic microorganisms: a review. *Environemental Science and Pollution Research*, 21(16), 9578-9588. DOI: 10.1007/s11356-014-3036-z.

Chakraborty, S., Khopade, A., Kokare, C., Mahadik, K., & Chopade, B. (2009). Isolation and characterization of novel α-amylase from marine *Streptomyces* sp. D1. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 58(1-4), 17-23. DOI: 10.1016/j.molcatb.2008.10.011.

Chakraborty, S., Khopade, A., Biao, R., Jian, W., Liu, X.Y., Mahadik, K., Chopade, B., Zhang, L., & Kokare, C. (2011). Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α-amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), 52-58. DOI: 10.1016/j.molcatb.2010.09.009.

Chandrasekaran, M., & Kumar, S.R. (2010). Marine microbial enzymes. In Werner, H., & Roken, S. (Eds.), Biotechnology. V.9. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS): Paris, France, pp. 47-79.

Chandrashekar, K., & Deosthale, Y.G. (1993). Proximate composition, amino acid, mineral, and trace element content of the edible muscle of 20 Indian fish species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 6(2), 195-200. DOI: 10.1006/JFCA.1993.1021.

Chantarasiri, A. (2015). Aquatic *Bacillus cereus* JD0404 isolated from the muddy sediments of mangrove swamps in Thailand and characterization of its cellulolytic activity. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 41(3), 257-264. DOI: 10.1016/j.ejar.2015.08.003.

Chaouqy, N.E., & El Marrakchi, A. (2005). Aspects chimiques et bactériologiques de l'anchois (*Engraulis encrasicholus*) entreposé sous glace et à moyenne température (20-25°C). *Revue de Médecine Vétérinaire*, 156(6), 341-349.

Cho, S.Y., Endo, Y., Fujimoto, K., & Kaneda, T. (1989). Oxidative deterioration of lipids in salted and dried sardine during storage at 5°C. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish*, 55(3), 541-544. DOI: 10.2331/suisan.55.541.

Clucas, I.J. (1982). Salting of fish: salt and methods. *In Fish Handling, Preservation and Processing: Part 2.* Report of the Tropical Products Institute, London, pp. 4-8.

Cojoc, R., Merciu, S., Popescu, G., Dumitru, L., Kamekura, M., & Enache, M. (2009). Extracellular hydrolytic enzymes of halophilic bacteria isolated from a subterranean rock salt crystal. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(5), 4458-4664.

Coppes, Z., Pavlisko, A., & Vecchi, S.D. (2002). Texture measurements in fish and fish products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 11(1), 89-105. DOI: 10.1300/J030v11n01_08.

Coronado, M.J., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., & Nieto, J.J. (2000). Production and biochemical characterization of an alpha-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana. FEMS Microbiology Letters*, 183(1), 67-71. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08935.x.

Couto, S.R.G., & Sanromán, M.A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 291-302. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022.

Curtis, R.I. (1993). Garum and Salsamenta: Production and Commerce in Materia Medica. *In L'antiquité classique*, Tome 62, pp. 498-499.

Czerner, M., & Yeannes, M.I. (2010). Brining kinetics of different cuts of anchovy (*Engraulis anchoita*). *International Journal of Food Science & Technology*, 45(10), 2001-2007. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02361.x.

Czerner, M., & Yeannes, M.I. (2013). Modeling the effect of temperature and lipid content on anchovy (*Engraulis anchoita*) salting kinetics. *Journal of Food Engineering*, 115(2), 164-172. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.10.004.

Czerner, M., & Yeannes, M.I. (2014). Bacterial Contribution to salted Anchovy (*Engraulis anchoita* Hubbs & Marinni, 1935) Ripening Process. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23(2), 102-114. DOI: 10.1080/10498850.2012.697537.

Czerner, M., Tomás, M.C., & Yeannes, M.I. (2011). Ripening of salted anchovy (*Engraulis anchoita*): Development of lipid oxidation, colour and other sensorial characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(4), 609-615. DOI: 10.1002/jsfa.4221.

Darah, I., Han, L.Z, Nuraqilah, Y., Isnaeni, & Lim Sheh, H. (2013). *Bacillus licheniformis* BT5.9 isolated from Changar Hot Spring, Malang, Indonesia, as a Potential Producer of Thermostable α-amylase. *Tropical Life Sciences Research*, 24(1), 71-84.

Das, K., Doley, R., & Mukherjee, A.K. (2004). Purification and biochemical characterization of a thermostable, alkaliphilic, extracellular α-amylase from *Bacillus subtilis* DM-03, a strain isolated from the traditional fermented food of India. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40, 291-298. DOI: 10.1042/BA20040034.

Dash, B.K, Rahman, M.M., & Sarker, P.K. (2015). Molecular identification of a newly isolated *Bacillus subtilis* BI19 and optimization of production conditions for enhanced production of extracellular amylase. *BioMed Research international*, 2015, 1-9. DOI: 10.1155/2015/859805.

DasSarma, P., Coker, J.A., Huse, V., & DasSarma, S. (2010). Halophiles, Industrial applications. In *Flickinger, M.C. (Ed.), Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 2769-2777. DOI: 10.1002/9780470054581.eib439.

DasSarma, S., & DasSarma, P. (2012). Halophiles. *eLS*. John Willey & Sons, Ltd: Chichester, 1-11. DOI: 10.1002/9780470015902.a0000394.pub3.

DasSarma, S., & DasSarma, P. (2015). Halophiles and their enzymes: negativity put to good use. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 120-126. DOI: 10.1016/j.mib.2015.05.009.

Dawson, K.S., Freeman, K.H., & Macalady, J.L. (2012). Molecular characterization of core lipids from halophilic archaea grown under different salinity conditions. *Organic Geochemistry*, 48, 1-8. DOI: 10.1016/j.orggeochem.2012.04.003.

De la Haba, R.R., Sánchez-Porro, C., Marquez, M.C., & Ventosa, A. (2011). Taxonomy of halophiles. In *Horikoshi, K. (Ed.), Extremophiles Handbook*. Springer Japan, Tokyo, Japan, pp. 255-308.

De Lourdes Moreno, M., Pérez, D., Garcia, M.T., & Mellado, E. (2013). Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. *Life*, 3(1), 38-51. DOI: 10.3390/life3010038.

De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., & Whitman, W.B. (2009). The *Firmicutes*. In *Garriry, G.M. (Ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed.V3, Springer-Verlag, New York: [I]-XXVI, pp.1-1422.

Deb, P., Talukdar, S.A., Mohsina, K., Sarker, P.K., & Sayem, S.M. A. (2013). Production and partial characterization of extracellular amylase enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* P-001. *SpringerPlus*, 2(1), 154. DOI: 10.1186/2193-1801-2-154.

Debashish, G., Malay, S., Barindra, S., & Joydeep, M. (2005). Marine enzymes. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 96, 189-218. DOI: 10.1007/b135785.

Delgado-García, M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar-González, C.N., Contreras-Esquivel, J.C., & Rodríguez-Herrera, R. (2012). Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculrure*, 92(13), 2575-2580. DOI: 10.1002/jsfa.5860.

Demirkan, E. (2011). Production, purification, and characterization of α -amylase by *Bacillus subtilis* and its mutant derivatives. *Turkish Journal of Biology*, 35, 705-712. DOI: 10.3906/biy-1009-113.

Demirkan, E.S., Mikami, B., Adachi, M., Higasa, T., & Utsumi, S. (2005). α-amylase from *B. amyloliquefaciens*: Purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli. Process Biochemistry*, 40(8), 2629-2636. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.08.015.

Demirkan, E., Sevgi, T., & Başkurt, M. (2017). Optimization of physical factors affecting the production of the α -amylase from a newly isolated *Bacillus* sp. M10 strain. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 7(1), 23-30.

Deutch, C. E., & Yang, S. (2020). Genomic sequencing of *Gracilibacillus dipsosauri* reveals key properties of a salt-tolerant α-amylase. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(7), 1049-1059. DOI: 10.1007/s10482-020-01417-2.

Deutch, C.E. (2002). Characterization of a salt-tolerant extracellular α-amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Letters in Applied Microbiology*, 35(1), 78-84. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2002.01142.x.

Dewi, R.S., Huda, N., & Ahmad, R. (2011). Changes in the physicochemical properties, microstructure and sensory characteristics of shark dendeng using different drying methods. *American Journal of Food Technology*, 6(2), 149-157. DOI: 10.3923/ajft.2011.149.157.

Dey, T.B., & Banerjee, R. (2014). Application of decolourized and partially purified polygalacturonase and α-amylase in apple juice clarification. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 97-104. DOI: 10.1590/s1517-838220140001000.

Dhawale, M.R., Wilson, J.J., Khachatourians, G.G., & Ingledew, W.M. (1982). Improved method for detection of starch hydrolysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 44(3), 747-750. DOI: 10.1128/aem.44.3.747-750.1982. Dheeman, D.S., Henehan, G.T.M., & Frías, J.M. (2011). Purification and properties of *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 lipase and its potential in flavour ester synthesis. *Bioresource Technology*, 102(3), 3373-3379. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.11.074.

Dhundale, V.R. (2015). Characterization of organic solvent tolerant halo-alkali thermostable amylase from *Bacillus cereus* OCW 3(1). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6(4), 457-469.

Du, R., Song, Q., Zhang, Q., Zhao, F., Kim, R.C., Zhou, Z., & Han, Y. (2018). Purification and characterization of novel thermostable and Ca-independent α-amylase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* BH072. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 1151-1156. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.004.

Dussault, H. P. (1955). An improved technique for staining red halophilic bacteria. *Journal of Bacteriology*, 70(4), 484-485. DOI: 10.1128/jb.70.4.484-485.1955.

EFSA, European Food Safety Authority. (2011). Scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. *EFSA Journal*, 9(10), 1-93. DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2393.

Ekunsaumi, T. (2002). Laboratory production and assay of amylase by fungi and bacteria. Bio-Link Organization, pp.1-8.

El Hidri, D., Guesmi, A., Najjari, A., Cherif, H., Ettoumi, B., Hamdi, C., Boudabous, A., & Cherif, A. (2013). Cultivation-dependant assessment, diversity, and ecology of haloalkaliphilic bacteria in arid saline systems of southern Tunisia. *BioMed Research International*, 2013, 1-15. DOI:10.1155/2013/648141.

El-Kady, E.M., Asker, M.S., Hassanein, M.S., Elmansy, E.A., & El-Beih, F.M. (2017). Optimization, production, and partial purification of thermostable α-amylase produced by marine bacterium *Bacillus* sp. NRC12017. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(8), 558-570. DOI: 10.25258/ijpcr.v9i08.9581.

Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P., & Srinivasulu, B. (2002). Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. *Process Biochemistry*, 38, 615-620.

Elmansy, E.A., Asker, M.S., El-Kady, E.M., Hassanein, S.M., & El-Beih, F.M. (2018). Production and optimization of α -amylase from thermo-halophilic bacteria isolated from different local marine environments. *Bulletin of the National Research Centre*, 42(1), 1-9. DOI: 10.1186/s42269-018-0033-2. El-Sebaiy, L.A., & Metwalli, S.M. (1989). Changes in some chemical characteristics and lipid composition of salted fermented Bouri fish muscle (*Mugil cephalus*). *Food Chemistry*, 31(1), 41-50. DOI: 10.1016/0308-8146(89)90149-0.

Emtenani, S., Asoodeh, A., & Emtenani, S. (2015). Gene cloning and characterization of a thermostable organic-tolerant α-amylase from *Bacillus subtilis* DR8806. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 290-298. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.08.023.

Enache, M., & Kamekura, M. (2010). Hydrolytic enzymes of halophilic microorganisms and their economic values. *Romanian Journal of Biochemistry*, 47(1), 47-59.

Esmaeili Dahesht, L., Negarestan, H., Eimanifar, A., Mohebbi, F., & Ahmadi, R. (2010). The fluctuations of physicochemical factors and phytoplankton populations of Urmia Lake, Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 9(3), 368-381.

Essghaier, B., Hedi, A., Bejji, M., Jijakli, H., Boudabous, A., & Sadfi-Zouaoui, N. (2012). Characterization of a novel chitinase from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus marismortui* strain M3-23. *Annals of Microbiology*, 62(2), 835-841. DOI: 10.1007/s13213-011-0324-4.

EUMOFA, European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products. (2018). Observatoire Européen des marchés des produits de la pêche et de l'aquaculture - L'anchois transformé en Italie, structure des prix dans la filière. Ed. Commission européenne, Direction Générale des Affaires Maritimes et de la Pêche, Bruxelles, pp. 1-30. DOI: 10.2771/031397.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2016). Fishery statistics collection: global production. FAO, Rome. http://www.fao.org/fishery/statistics/global-production/en.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2018). The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals. http://www.fao.org/3/i9540en/I9540EN.pdf.

Farag, A.M., Fawzyb, A., El-Naggarb M.Y., & Ghanem, K.M. (2021). Biodegradation and enhancement of 2, 4-dichlorophenol by marine halophilic *Bacillus subtilis* AAK. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 47(2), 117-123. DOI: 10.1016/j.ejar.2021.04.005.

Febriani, F., Rayyana, Ulya, M., Oesman, F., Akhmaloka., & Iqbalsyah, T.M. (2019). Low molecular weight alkaline thermostable α-amylase from *Geobacillus* sp. nov. *Heliyon*, 5(7), 1-7. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02171. Felix, M., Ameztoy, I., Ramírez, E., & Yeannes, M.I. 2004. Incidence of different genus of halophilic arqueobacteria in samples of matured salted anchovy (*Engraulis anchoita*). *Biocell*, 28(2), 226.

Felix, M.M., Ramírez, E.E. & Yeannes, M.I. (2007). Bacterias halófilas extremas deteriorantes en anchoíta salada y su vida útil. *Revista de Ciencias Agrarias y de Tecnología de Alimentos*, 24, 1668-1940.

Felix, M.M., Czerner, M., Ameztoy, I., Ramírez, E., & Yeannes, M.I. (2016). Investigation of *Halococcus morrhuae* in salted-ripened anchovy products. *International Food Research Journal*, 23(6), 2668-2674.

Filsinger, B., Barassi, C.A., Lupín, H.M., & Trucco, R.E. (1982). An objective index for the evaluation of the ripening of salted anchovy. *International Journal of Food Science & Technology*, 17(2), 193-200. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1982.tb00175.x.

Filsinger, B.E. (1987). Effect of pressure on the salting and ripening process of anchovies (*Engraulis anchoita*). *Journal of Food Science*, 52(4), 919-921. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1987.tb14242.x.

Flores-Gallegos, A.C., Delgado-García, M., Ascacio-Valdés, J.A., Villareal-Morales, S., Michel-Michel, M.R., Aguilar-González, C.N., & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Hydrolases of halophilic origin with importance for the food industry. *Enzymes in Food Biotechnology*, 197-219. DOI: 10.1016/B978-0-12-813280-7.00013-X.

Fongaro, G., Maia, G.A., Rogovski, P., Cadamuro, R.D., Lopes, J.C., Moreira, R.S., Camargo, A.F., Scapini, T., Stefanski, F.S., Bonatto, C., Souza, D.S.M., Stoco, P.H., Duarte, R.D.T., Cabral da Cruz, A.C., Wagner, G., & Treichel, H. (2020). Extremophile microbial communities and enzymes for bioenergetic application based on multiomics tools. *Current Genomics*, 21(4), 240-252. DOI: 10.2174/1389202921999200601144137.

Fréon, P., Cury, P., Shannon, L., Roy, C. (2005). Sustainable exploitation of small pelagic fish stocks challenged by environmental and ecosystem changes: A review. *Bulletin of Marine Science*, 76(2), 385-462.

Fuka, M. M., Tanuwidjaja, I., Zgomba Maksimovic, A., Zunabovic-Pichler, M., Kublik, S., Hulak, N., Domig, K.J., & Schloter, M. (2020). Bacterial diversity of naturally fermented game meat sausages: Sources of new starter cultures. *LWT-Food Science and Technology*, 118(3), 1-24. DOI: 10.1016/j. lwt.2019.108782.

Fukushima, T., Mizuki, T., Echigo, A., Inoue, A., & Usami, R. (2005). Organic solvent tolerance of halophilic α-amylase from a haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles*, 9(1), 85-89. DOI: 10.1007/s00792-004-0423-2.

Fuwa, H. (1954). A new method of micro determination of amylase activity by the use of amylose as a substrate. *The Journal of Biochemistry*, 41(5), 583-603. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a126476.

Galaţchi, M., Oros, A., Coatu, V., Costache, M., Coprean, D., & Galaţchi, L.D. (2017). Pollutant bioaccumulation in anchovy (*Engraulis encrasicolus*) tissue, fish species of commercial interest at the Romanian Black Sea coast. *Ovidius University Annals of Chemistry*, 28(1), 11-17. DOI: 10.1515/auoc-2017-0003.

Gallart-Jornet, L., Barat, J.M., Rustad, T., Erikson, U., Escriche, I., & Fito, P. (2007). A comparative study of brine salting of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Engineering*, 79(1), 261-270. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2006.01.053.

Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K.M., & Pandey, A. (2006). Solid culturing of *Bacillus amyloliquifaciens* for alpha-amylase production. *Food Technology* and *Biotechnology*, 44(2), 269-274.

Gassem, M. A. (2019). Microbiological and chemical quality of a traditional salted-fermented fish (Hout-Kasef) product of Jazan Region, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(1), 137-140. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.04.003.

Gautam, P., Sabu, A., Pandey, A., Szakacs, G., & Soccol, C.R. (2002). Microbial production of extracellular phytase using polystyrene as inert solid support. *Bioresource Technology*, 83(3), 229-233. DOI: 10.1016/s0960-8524(01)00215-2.

Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., & Krieg, N.R. (1994). Methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology*, Washington. 791p. DOI: 10.1002/food.19960400226.

Giyatmi, G., & Irianto, H.E. (2017). Enzymes in fermented fish. *Advances in Food and Nutrition Research*, 80, 199-216. DOI: 10.1016/bs.afnr.2016.10.004.

Gökoglu, N., Özden, Ö., Erkan, N., Baygar, T., & Metin, S. (1999). Seasonal variation in fat content of anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *International Journal of Food Science & Technology*, 34(4), 401-402. DOI: 10.1046/j.1365-2621.1999.00285.x.

Gómez-Villegas, P., Vigara, J., Romero, L., Gotor, C., Raposo, S., Gonçalves, B., & Léon, R. (2021). Biochemical characterization of the amylase activity from the new haloarchaeal strain *Haloarcula* sp. HS isolated in the Odiel Marshlands. *Biology*, 10(4), 337. DOI: 10.3390/biology10040337.

Gonzalez, C., Gutierrez, C., & Ramirez, C. (1978). *Halobacterium vallismortis* sp.nov. an amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(6), 710-715. DOI: 10.1139/m78-119.

Gonzalez-Domenech, C.M., Martinez-Checa, F., Quesada, E., & Bejar, V. (2009). *Halomonas fontilapidosi* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(6), 1290-1296. DOI: 10.1099/ijs.0.004275-0.

Goulas, A.E., & Kontominas, M.G. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*, 93(3), 511-520. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.09.040.

Govender, L., Naidoo, L., & Setati, M.E. (2013). *Nesterenkonia suensis* sp. nov., a haloalkaliphilic actinobacterium isolated from a salt pan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(1), 41-46. DOI: 10.1099/ijs.0.035006-0.

Gram, L., & Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal* of *Food Microbiology*, 33(1), 121-137. DOI: 10.1016/0168-1605(96)01134-8.

Graziano, G., & Merlino, A. (2014). Molecular bases of protein halotolerance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1844(4), 850-858. DOI: 10.1016/j.bbapap.2014.02.018.

Guiraud, J.P. (1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Donod, Paris. 652p.

Guiraud, J.P. (2003). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod, Paris. 696p.

Gülyavuz, H., & Ünlüsayın, M. (1999). Seafood processing technology. Süleyman Demirel University Fisheries Faculty of Eğirdir. Sahin printing press, Isparta, 359p.

Gunde-Cimerman, N., Plemenitaš, A., & Oren, A. (2018). Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(3), 353-375. DOI: 10.1093/femsre/fuy009.

Gunde-Cimerman, N., Ramos, J., & Plemenitaš, A. (2009). Halotolerant and halophilic fungi. *Mycological Research*, 113(11), 1231-1241. DOI: 10.1016/j.mycres.2009.09.002.

Gupta, A., & Khare, S.K. (2009). Enzymes from solvent tolerant microbes: useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 29(1), 44-54. DOI: 10.1080/07388550802688797.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatran, H., Goswami, K.V., & Chauhan, B. (2003). Microbial α-amylase: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00053-0.

Gurung, N., Ray, S., Bose, S., & Rai, V. (2013). A Broader View: Microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *BioMed Research International*, 2013, 1-18. DOI: 10.1155/2013/329121.

Gusakov, A.V., Kondratyeva, E.G., & Sinitsyn, A.P. (2011). Comparison of two methods for assaying reducing sugars in the determination of carbohydrase activities. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 1-4. DOI: 10.1155/2011/283658.

Hammami, A., Fakhfakh, N., Abdelhedi, O., Nasri, M., & Bayoudh, A. (2018). Proteolytic and amylolytic enzymes from a newly isolated *Bacillus mojavensis* SA: Characterization and applications as laundry detergent additive and in leather processing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 56-68. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.11.148.

Harding, T., & Simpson, A.G.B. (2018). Recent advances in halophilic protozoa research. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 65(4), 556-570. DOI: 10.1111/jeu.12495.

Hardy, N., Moreaud, M., Guillaume, D., Augier, F., Nienow, A., Béal, C., & Ben Chaabane, F. (2017). Advanced digital image analysis method dedicated to the characterization of the morphology of filamentous fungus. *Journal of Microscopy*, 266 (2), 126-140. DOI: 10.1111/jmi.12523.

Harley, J. P. & Harley-Prescott. (2002). Laboratory exercises in microbiology. 5thEd. The McGraw-Hill Companies, 350p.

Hasan, F., & Hameed, A. (2001). Optimization of lipase production from *Bacillus* sp. *Pakistan Journal of Botany*, 33,789-796.

Hasan, M.M., Marzan, L.W., Hosna, A., Hakim A., & Azad A.K. (2017). Optimization of some fermentation conditions for the production of extracellular amylases by using *Chryseobacterium* and *Bacillus* isolates from organic kitchen wastes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(1), 59-68. DOI: 10.1016/j.jgeb.2017.02.009.

Hernández-Herrero, M.M., Roig-Sagués, A.X., López-Sabater, E.I., Rodriguez-Jerez, J.J., & Mora-Ventura, M.T. (1999a). Total volatile basic nitrogen and other physicochemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies. *Journal of Food Science*, 64(2), 344-347. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1999.tb15897.x.

Hernández-Herrero, M.M., Roig-Sagués, A.X., López-Sabater, E.I., Rodríguez Jerez, J.J., & Mora-Ventura, M.T. (1999b). Protein hydrolysis and proteinase activity during the ripening of salted anchovy (*Engraulis encrasicholus* L.). A microassay method for determining the protein hydrolysis. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47(8), 3319-3324. DOI: 10.1021/jf980809j.

Hernández-Herrero, M.M., Roig-Sagués, A.X., López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J.J., & Mora-Ventura, M.T. (2000). SDS-PAGE of salted anchovies (*Engraulis encrasicholus* L) during the ripening process. *European Food Research and Technology*, 212(1), 26-30. DOI: 10.1007/s002170000197.

Hernández-Herrero, M.M., Roig-Sagués, A.X., López-Sabater, E.I., Rodríguez-Jerez, J.J., & Mora-Ventura, M.T. (2002). Influence of raw fish quality on some physicochemical and microbiological characteristics as related to ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicholus* L.). *Journal of Food Science*, 67(7), 2631-2640. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb08790.x.

Hollo, J., & Szeitli, J. (1968). The reaction of starch with iodine. In *Rodely, J.A. (Ed.), Starch and its derivatives*. 4thEd. Chapman and Hall, pp. 203-246.

Horner, W.F.A. (1992). Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). In *Hall, G.M. (Ed.), Fish Processing Technology*. Blackie Academic and Professional, London, pp. 31-70.

Huss, H.H., &Valdimarson, G. (1990). Microbiology of salted fish. FAO Food Tech. News, 10(1), 3-5.

Hutcheon, G.W., Vasisht, N., & Bolhuis, A. (2005). Characterisation of a highly stable αamylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*, 9(6), 487-495. DOI: 10.1007/s00792-005-0471-2.

ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1983). Microorganisms in foods 1. Techniques of microbiological analyses, Acribia, Zaragoza, Spain.

Igarashi, K., Hatada, Y., Hagihara, H., Saeki, K., Takaiwa, M., Eumura, T., Ara, K., Ozaki, K., Kawai, M., Kobayashi, T., & Ito, S. (1998). Enzymatic properties of a novel liquefying α-amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3382-3389. DOI: 10.1128/AEM.64.9.3282-3289.1998.

ISO 15213. (2003). Microbiologie des aliments-Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.

Jemaa, S., Cuvilliers, P., Bacha, M., Khalaf, G., & Amara, R. (2016). Etude du régime alimentaire de l'anchois Européen (*Engraulis encrasicolus*) en Atlantique Nord-est et en Méditerranée. *Lebanese Science Journal*, 17(1), 75-90. DOI: 10.22453/LSJ-017.1.075090.

Jhon, J. (2017). Amylases- bioprocess and potential applications: A review. *International Journal* of *Bioinformatics and Biological Sciences*, 5(2), 41-50. DOI: 10.5958/2321-7111.2017.00006.3.

Jiang, W., Li, C., Xu, B., Dong, X., Ma, N., Yu, J., Wang, D., & Xu, Y. (2014). *Halomonas shantousis* sp. nov., a novel biogenic amines degrading bacterium isolated from Chinese fermented fish sauce. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106(6), 1073-1080. DOI: 10.1007/s10482-014-0275-4.

Jiang, T., Cai, M., Huang, M., He, H., Lu, J., Zhou, X., & Zhang, Y.J. (2015). Purification, characterization of a thermostable raw-starch hydrolyzing α-amylase from deepsea thermophile *Geobacillus* sp. *Protein Expression and Purification*, 114, 15-22. DOI: 10.1016/j.pep.2015.06.002.

Jittinandana, S., Kenney, P.B., Slider, S.D., & Kiser, R.A. (2002). Effect of brine concentration and brining time on quality of smoked rainbow trout fillet. *Journal of Food Science*, 67(6), 2095-2099. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09507.x.

Joffin, J.N., & Leyral, G. (2006). Microbiologie Technique. Tome 1. Dictionnaire des techniques. Canopé-CRDP de l'académie de Bordeaux, France. 363p.

Journal Officiel de la République Algérienne. (2017). 2 Juillet 2017, N°39, pp.11-32.

Jujjavarapu, S.E., & Dhagat, S. (2019). Evolutionary trends in industrial production of alpha-amylase. *Recent Pat Biotechnol*, 13(1), 4-18. DOI: 10.2174/2211550107666180816093436.

Jung, M.J., Roh, S.W., Kim, M.S., & Bae, J.W. (2010). *Lentibacillus jeotgali* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(5), 1017-1022. DOI: 10.1099/ijs.0.013565-0.

Kalantzi, I., Pergantis, S.A., Black, K.D., Shimmield, T.M., Papageorgiou, N., Tsapakis,
M., & Karakassis, I. (2016). Metals in tissues of seabass and seabream reared in sites with oxic and anoxic substrata and risk assessment for consumers. *Food Chemistry*, 194, 659-670. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.072.

Kar, S., & Ray, R.C. (2008). Partial characterization and optimization of extracellular thermostable Ca²⁺-inhibited α -amylase production by *Streptomyces erumpens* MTCC 7317. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 67(1), 58-64.

Karaçam, H., Kutlu, S., & Köse, S. (2002). Effect of salt concentrations and temperature on the quality and shelf-life of brined anchovies. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(1), 19-28. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2002.00526.x.

Karachle, P.K., & Stergiou, K.I. (2013). Feeding and ecomorphology of three clupeoids in the North Aegean Sea. *Mediterranean Marine Science*, 15(1), 9-26. DOI: 10.12681/mms.350.

Karan, R., & Khare, S.K. (2011). Stability of haloalkaliphilic *Geomicrobium* sp. protease modulated by salt. *Biochemistry*, 76(6), 686-693. DOI: 10.1134/S0006297911060095.

Karan, R., Singh, S., Kapoor, S., & Khare, S. (2011). A novel organic solvent tolerant protease from a newly isolated *Geomicrobium* sp. EMB2 (MTCC 10310): production optimization by response surface methodology. *New Biotechnol*, 28(2), 136-145. DOI: 10.1016/j.nbt.2010.10.007.

Karan, R., Kumar, S., Sinha, R., & Khare, S.K. (2012). Halophilic microorganisms as source of novel enzymes. In *Satyanarayana*, *T., Johri, B.N., & Prakash, A. (Eds.), Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 555-579.

Kaya, Y., & Turan, H. (2010). Comparison of protein, lipid and fatty acids composition of anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) during the commercial catching season. *Journal of Muscle Foods*, 21(3), 474-483. DOI: 10.1111/j.1745-4573.2009.00196.x.

Kennedy, S.P., Ng, W.V., Salzberg, S.L., Hood, L., & DasSarma, S. (2001). Understanding the adaptation of *Halobacterium* species NRC-1 to its extreme environment through computational analysis of its genome sequence. *Genome Research*, 11(10), 1641-1650. DOI: 10.1101/gr.190201.

Khanderparker, R., Verna, P., Meena, R.M., & Deobagkar, D.D. (2011). Phylogenetic diversity of carbohydrate degrading culturable bacteria from Mandovi and Zuari estuaries, Goa, west coast of India. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 95(4), 359-366. DOI: 10.1016/j.ecss.2011.09.004.

Kharroub, K., Gomri, M.A., & Monteoliva-Sanchez, M. (2015). Diversity of Halophilic *Archaea* from Ezzemoul Sabkha in Algeria. *Óbuda University e-Bulletin*, 5(1), 121-127.

Kikani, B. A., & Singh, S. P. (2011). Single step purification and characterization of a thermostable and calcium independent α-amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* TSWK-1 isolated from Tulsi Shyam hot spring reserviore, Gujrat (India). *International Journal of Biological Macromolecules*, 48(4), 676-681. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.02.010.

Kim, D.H., Morimoto, N., Saburi, W., Mukai, A., Imoto, K., Takehana, T., Koike, S., Mori, H., & Matsui, H. (2012). Purification and characterization of a liquefying α-amylase from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. AAH-31. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(7), 1378-1383. DOI: 10.1271/bbb.120164.

Kiran, E.U., Trzcinski, A.P., Ng, W.J., & Liu, Y. (2014). Bioconversion of food waste to energy: A review. *Fuel*, 134, 389-399. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.05.074.

Kiran, K.K., & Chandra, T.S. (2008). Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(5), 1023-1031. DOI: 10.1007/s00253-007-1250-z.

Kobayashi, T., Kanai, H., Hayashi, T., Akiba, T., Akaboshi, R., & Horikoshi, K. (1992). Haloalkaliphilic maltotriose-forming alpha-amylase from the archaebacterium *Natronococcus* sp. strain Ah-36. *Journal of Bacteriology*, 174(11), 3439-3444. DOI: 10.1128/jb.174.11.3439-3444.1992.

Kong, F., Oliveira, A., Tang, J., Rasco, B., & Crapo, C. (2008). Salt effect on heat-induced physical and chemical changes of salmon fillet (*O. gorbuscha*). *Food Chemistry*, 106 (3), 957-966. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.07.008.

Kothari, M.N., Kulkarni, J.A., Maid, P.M., & Baig M.M.V. (2013). Clarification of apple juice by using enzymes and their mixture. *World Research Journal of Biotechnology*, 1(2), 29-31.

Kumar, A., & Agrawal, A. (2020). Recent trends in solid waste management status, challenges, and potential for the future Indian cities-A review. *Current Research in Environmental Sustainability*, 2, 1-19. DOI: 10.1016/j.crsust.2020.100011.

Kumar, S., & Khare, S.K. (2012). Purification and characterization of maltooligosaccharideforming alpha-amylase from moderately halophilic *Marinobacter* sp. EMB8. *Bioresource Technology*, 116, 247-251. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.11.109.

Kumar, S., & Khare, S.K. (2015). Chloride activated halophilic α-amylase from *Marinobacter* sp. EMB8: Production optimization and nanoimmobilization for efficient starch hydrolysis. *Enzyme Research*, 2015(2), 1-9. DOI: 10.1155/2015/859485.

Kumar, D., Yadav, K.K., & Singh, M. (2011). Hydrolysis of wood saw dust by combined chemical pretreatment and enzymatic methods for lignocellulosic saccharification. *GERF Bulletin of Bio-sciences*, 2(2), 29-31.

Kumar, S., Karan, R., Kapoor, S., Singh, S.P., & Khare, S.K. (2012). Screening and isolation of halophilic bacteria producing industrially important enzymes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1595-1603. DOI: 10.1590/S1517-83822012000400044.

Kumar, S., Grewal, J., Sadaf, A., Hemamalini, R., & Khare, S.K. (2016). Halophiles as a source of polyextremophilic α-amylase for industrial applications. *AIMS Microbiology*, 2(1), 1-26. DOI: 10.3934/microbiol.2016.1.1.

Kunamneni, A., Permaul, K., & Singh, S. (2005). Amylase production in solid state fermentation by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(2), 168-171. DOI: 10.1263/jbb.100.168.

Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations. In *Kushner, D.J. (Ed.), Microbial Life in Extreme Environments*. Academic Press, London, pp. 317-368.

Kushner, D., & Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. In *Rodríguez-Valera, F. (Ed.), Halophilic Bacteria*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 87-103.

Kwon, B.G., Na, S.H., Lim, H.J., Lim, C.S., & Chung, S.Y. (2014). Slurry phase decomposition of food waste by using various microorganisms. *Journal of Korean Society of Environmental Engineers*, 36(5), 303-310. DOI: 10.4491/KSEE.2014.36.5.303.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. DOI: 10.1038/227680a0.

Lai, Q., Liu, Y., & Shao, Z. (2013). *Bacillus xiamenensis* sp. nov., isolated from intestinal tract contents of a flathead mullet (*Mugil cephalus*). *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(1), 99-107. DOI: 10.1007/s10482-013-0057-4.

Lal, N., Jyoti, J., & Sachan, P. (2016). Optimization of nitrogen source (s) for the growth and amylase production from *Bacillus licheniformis* JAR-26 under submerged fermentation. *Indian Journal of Biology*, 3(2), 127-132. DOI: 10.21088/ijb.2394.1391.3216.6.

Larpent, J.P. (1997). Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire. Ed. Lavoisier Tec & Doc, 1072p.

Lee, D.H., Kim, H.R., Chung, C.H., Lim, J.G., Kim, S., Kim, S.K., Ku, H.J., Kim, H., Ryu, S., Choi, S.H., & Lee, J.H. (2015). Complete genome sequence of *Bacillus cereus* FORC_005, a food-borne pathogen from the soy sauce braised fish-cake with quail-egg. *Standards in Genomic Sciences*, 10(1), 1-8. DOI: 10.1186/s40793-015-0094-x.

Léopold, M. (2004). Guide des poissons de mer de Guyane. Ed. Ifremer, 214p.

Li, X., & Yu, H. Y. (2011). Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9. *Journal of industrial microbiology* & *biotechnology*, 38(11), 1837-1843. DOI: 10.1007/s10295-011-0972-1.

Li, X., & Yu, H.Y. (2012a). Purification and characterization of novel organic-solventtolerant β-amylase and serine protease from a newly isolated *Salimicrobium halophilum* strain LY20. *FEMS Microbiology Letters*, 329(2), 204-211. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02522.x. **Li, X., & Yu, H.Y. (2012b).** Characterization of organic solvent-tolerant α-amylase from a halophilic isolate *Thalassobacillus* sp. LY-18. *Folia Microbiologica*, 57(5), 447-453. DOI: 10.1007/s12223-012-0160-3.

Lim, S.J., Oslan, S.N.H., & Oslan, S.N. (2020). Purification and characterisation of thermostable α-amylases from microbial sources. *BioResources*, 15(1), 2005-2029. DOI: 10.15376/biores.15.1.2005-2029.

Lindegren, M., Checkley, D.M., Koslow, J.A., Goericke, R., & Ohman, M.D. (2018). Climate-mediated changes in marine ecosystem regulation during El Niño. *Global Change Biology*, 24(2), 796-809. DOI: 10.1111/gcb.13993.

Liszka, M.J., Clark, M.E., Schneider, E., & Clark, D.S. (2012). Nature versus nurture: developing enzymes that function under extreme conditions. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 3(1), 77-102. DOI: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114239.

Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., & Shao, Z. (2017). Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2499-2508. DOI: 10.1099/ijsem.0.001821.

Llorente Holgado, R., Altonaga Zubiaga, M., Peral Díez, I., Ibargüen Salaverri, M., Gartzia & Palacios, I. (2007). Salting dynamics for anchovy (*Engraulis encrasicholus*) with salt replacers. Proceedings in the European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6), Copenhagen.

Logan, N.A., & De Vos, P. (2015). *Bacillus* Cohn 1872, 174^{AL}. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. NJ: John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust. pp. 1-163.

Logan, N.A., Berge, O., Bishop, A.H., Busse, H.J., De Vos, P., Fritze, D., Heyndrickx, M., Kämpfer, P., Rabinovitch, L., Salkinoja-Salonen, M.S., Seldin, L., & Ventosa, A. (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 2114-2121. DOI: 10.1099/ijs.0.013649-0.

Lonsane, B.K., Ghildyal, N.P., Budiatman, S., & Ramakrishna, S.V. (1985). Engineering aspects of solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 7, 258-265.

Luo, H.Y., Wang, Y.R., Miao, L.H., Yang, P.L., Shi, P.J., Fang, C.X., Yao, B., & Fan, Y.L. (2009). *Nesterenkonia alba* sp. nov., an alkaliphilic actinobacterium isolated from the black liquor treatment system of a cotton pulp mill. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(4), 863-868. DOI: 10.1099/ijs.0.003376-0.

Madern, D., & Zaccai, G. (2004). Molecular adaptation: the malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium *Salinibacter ruber* behaves like a non-halophilic protein. *Biochimie*, 86(4-5), 295-303. DOI: 10.1016/j.biochi.2004.04.004.

Madern, D., Ebel, C., & Zaccai, G. (2000). Halophilic adaptation of enzymes. *Extremophiles*, 4(2), 91-98. DOI: 10.1007/s007920050142.

Madigan, M.T., & A. Oren, A. (1999). Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*, 2(3), 265-269. DOI: 10.1016/s1369-5274(99)80046-0.

Madureira, L.S., Castello, J.P., Prentice-Hernández, C., Queiroz, M.I., Espírito Santo, M.L., Ruiz, W.A., Raggi Abdallah, P., Hansen, J., Bertolotti, M.I., Manca, E., Yeannes, M.I., Avdalov, N., & Fernández Amorín, S. (2009). Current and potential alternative food uses of the Argentine anchoita (*Engraulis anchoita*) in Argentina, Uruguay and Brazil. In *Hasan, M.R., & Halwart, M. (Eds.), Fish as feed inputs for aquaculture: practices, sustainability and implications.* FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, N°518. Rome, FAO, pp. 269-287.

Mageswari, A., Parthiban, S., Suganthi, C., Karthikeyan, S., Babu, S., & Gothandam, K.M. (2012). Optimization and immobilization of amylase obtained from halotolerant bacteria isolated from solar salterns. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 10(2), 201-208. DOI: 10.1016/j.jgeb.2012.09.001.

Mainka, T., Weirathmüller, D., Herwig, C., & Pflügl, S. (2021). Potential applications of halophilic microorganisms for biological treatment of industrial process brines contaminated with aromatics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 48(1-2), 1-19. DOI: 10.1093/jimb/kuab015.

Majumdar, R.K., & Basu, S. (2010). Characterization of the traditional fermented fish product *Lona ilish* of Northeast India. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 9(3), 453-458.

McGenity, T.J., & Oren, A. (2012). Hypersaline environments. In *Bell, E.M. (Ed.), Life at Extremes: Environments, Organisms and Strategies for Survival*. CAB International, Dunbeg, UK, pp. 402-437.

Mégraud, F. (2011). De l'agent infectieux à l'hôte-bactériologie : Physiologie bactérienne, pouvoir pathogène des bactéries. Cours PCEM 2, pp.1-6.

Mehta, D., & Satyanarayana, T. (2016). Bacterial and archaeal α-amylase: diversity and amelioration of the desirable characteristics for industrial applications. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-21. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01129.

Mendu, D.R., Ratnam, B.V.V., Purnima, A., & Ayyanna, C. (2005). Affinity chromatography of α-amylase from *Bacillus licheniformis*. *Enzyme* and *Microbial Technology*, 37(7), 712-717. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.04.015.

Mesbah, N.M., & Wiegel, J. (2012). Life under multiple extreme conditions: Diversity and physiology of the halophilic alkalithermophiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4074-4082. DOI: 10.1128/AEM.00050-12.

Mesbah, N.M., & Wiegel, J. (2014). Halophilic alkali- and thermostable amylase from a novel polyextremophilic *Amphibacillus* sp. NM-Ra2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 70, 222-229. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.06.0.

Mesbah, N.M., & Wiegel, J. (2018). Biochemical characterization of halophilic, alkalithermophilic amylopullulanase PulD7 and truncated amylopullulanases PulD71N and PulD71C. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111, 632-638. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.069.

Mevarech, M., Frolow, F., & Gloss, L.M. (2000). Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophysical Chemistry*, 86 (2-3), 155-164. DOI: 10.1016/s0301-4622(00)00126-5.

Mijts, B.N., & Patel, B.K.C. (2002). Cloning, sequencing and expression of an α-amylase gene, amyA, from the thermophilic halophile *Halothermothrix orenii* and purification and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Microbiology*, 148(8), 2343-2349. DOI: 10.1099/00221287-148-8-2343.

Miller, G.L. (1959). Use of Dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-429. DOI: 10.1021/ac60147a030.

Mishra, S., & Behera, N. (2008). Amylase activity of a starch degrading bacteria isolated from soil receiving kitchen waste. *African Journal of Biotechnology*, 7(18), 3326-3331.

Mohamed, S.A., Azhar, E.I., Ba-Akdah, M.M., Tashkandy, N.R., & Kumosani, T.A. (2011). Production, purification and characterization of α-amylase from *Trichoderma harzianum* grown on mandarin peel. *African Journal of Microbiology Research*, 5(7), 930-939. DOI: 10.5897/AJMR10.890.

Morello, E.B., & Arneri, E. (2009). Anchovy and sardine in the Adriatic Sea - An ecological review. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 47, 209-256.

Morrissey, P.A., Mulvihill, D.M., & O'Neill, E.M. (1987). Functional properties of muscle proteins. In *Hudson, B.J.F. (Ed.), Developments in Food Proteins*. Elsevier Applied Science Publishers, New York, pp.195-225.

Moschetti, G., Aponte, M., Blaiotta, G., Casaburi, A., Chiurazzi, M., Ventorino, V., & Villani, F. (2006). Characterization of halophilic Archaea isolated from different hypersaline ecosystems. *Annals of Microbiology*, 56(2), 119-127.

Moshfegh, M., Shahverdi, A.R., Zarrini, G., & Faramarzi, M.A. (2013). Biochemical characterization of an extracellular polyextremophilic α-amylase from the halophilic archaeon *Halorubrum xinjiangense*. *Extremophiles*, 17(4), 677-687. DOI: 10.1007/s00792-013-0551-7.

Mountfort, D.O., Rainey, F.A., Burghardt, J., Kaspar, H.F., & Stackebrandt, E. (1998). *Psychromonas antarcticus* gen. nov., sp. nov., A new aerotolerant anaerobic, halophilic psychrophile isolated from pond sediment of the McMurdo ice shelf, antarctica. *Archives of Microbiology*, 169(3), 231-238. DOI: 10.1007/s002030050566.

Mozaffarian, D., & Wu, J.H. (2011). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(20), 2047-2067. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.06.063.

Munawar, N., & Engel, P.C. (2013). Halophilic enzymes: Characteristics, structural adaptation and potential applications for biocatalysis. *Current Biotechnology*, 2(4), 334-344. DOI: 10.2174/18722083113076660033.

Münster, U., Einiö, P., Nurminen, J., & Overbeck, J. (1992). Extracellular enzymes in a polyhumic lake: important regulators in detritus processing. *Hydrobiologia*, 229, 225-238.

Mwirichia, R., Muigai, A.W., Tindall, B., Boga, H.I., & Stackebrandt, E. (2010). Isolation and characterisation of bacteria from the haloalkaline Lake Elmenteita, Kenya. *Extremophiles*, 14(4), 339-348. DOI: 10.1007/s00792-010-0311-x.

Namwong, S., Tanasupawat, S., Kudo, T., & Itoh, T. (2011). *Haloarcula salaria* sp. nov. and *Haloarcula tradensis* sp. nov., isolated from salt in Thai fish sauce. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 231-236. DOI: 10.1099/ijs.0.021790-0.

Nercessian, D., Di Meglio, L., De Castro, R., & Paggi, R. (2015). Exploring the multiple biotechnological potential of halophilic microorganisms isolated from two Argentinean salterns. *Extremophiles*, 19(6), 1133-1143. DOI: 10.1007/s00792-015-0785-7.

NF EN ISO 12966-4. (2015). Animal and vegetable fats and oils - Gas chromatography of fatty acid methyl esters-Part 4: determination by capillary gas chromatography. Classification index: **T60-233-4**.

NF ISO 4832. (2006). Microbiology of Food And Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method For The Enumeration Of Coliforms-Colony Count Technique. Association Française de Normalisation, AFNOR.

NF V04-404. (2001). Meat, meat products and fishery products - Determination of total ash-Viandes, produits à base de viandes et produits de la pêche. Association Française de Normalisation, AFNOR.

Ng, W.L., Ciufo, S.A., Smith, T.M., Bumgardner, R.E., Baskin, D., Faust, J., Hall, B., Loretz, C., Seto, J., Slagel, J., Hood, L., & DasSarma, S. (1998). Snapshot of a large dynamic replicon from a halophilic Archaeon: Megaplasmid or minichromosome? Genome Research, 8(11), 1131-1141. DOI: 10.1101/gr.8.11.1131.

Nisha, K., Ajay, P., & Veena, J. (2013). Immobilization of α-amylase purified from *Bacillus cereus* MTCC 10205 by entrapment and adsorption on various support systems. *Applied Biological Research*, 16(1), 21-30. DOI: 10.5958/0974-4517.2014.00043.3.

Niyonzima, F.N., & More, S.S. (2014). Concomitant production of detergent compatible enzymes by *Bacillus flexus* XJU-1. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(3), 903-910. DOI: 10.1590/S1517-83822014000300020.

Nketsia-Tabiri, J., & Sefa-Dedeh, S. (1995). Optimization of process, conditions and quality of salted dried tilapia (*Oreochromis miloticus*) using response surface methodology. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 69(1), 117-127. DOI: 10.1002/jsfa.2740690118.

Nusrat, A., & Rahman, S.R. (2007). Comparative studies on the production of extracellular alpha-amylase by three mesophilic *Bacillus* isolates. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24(2), 129-132. DOI: 10.3329/bjm.v24i2.1257.

Obi, C.N., Okezie, O., & Ezugwu, A.N. (2019). Amylase production by solid state fermentation of agro-industrial wastes using *Bacillus* species. *European Journal of Nutrition* & *Food Safety*, 9(4), 408-414. DOI: 10.9734/ejnfs/2019/v9i430087.

Onishi, H., & Hidaka, O. (1978). Purification and properties of amylase produced by a moderately halophilic *Acinetobacter* sp. *Canadian journal of microbiology*, 24(9), 1017-1023. DOI: 10.1139/m78-169.

Onishi, H., & Sonoda, K. (1979). Purification and some properties of an extracellular amylase from a moderate halophile, *Micrococcus halobius*. *Applied Environmental Microbiology*, 38(4), 616-620. DOI: 10.1128/aem.38.4.616-620.1979.

Ordoñez, O.F., Rasuk, M.C., Soria, M.N., Contreras, M., & Farías, M.E. (2018). Haloarchaea from the Andean Puna: Biological role in the energy mof arsenic. *Microbial Ecology*, 76(3), 695-705. DOI: 10.1007/s00248-018-1159-3.

Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 334-348. DOI: 10.1128/MMBR.63.2.334-348.1999.

Oren, A. (2002) Molecular ecology of extremely halophilic *Archaea* and *Bacteria*. *FEMS Microbiol Ecol*, 39(1), 1-7. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2002.tb00900.x.

Oren, A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(1), 1-13. DOI: 10.1186/1746-1448-4-2.

Oren, A. (2013a). Life at high salt concentrations. In *The Prokaryotes-Prokaryotic Communities and Ecophysiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 421-440.

Oren, A. (2013b). Two centuries of microbiological research in the Wadi Natrun, Egypt: A model system for the study of the ecology, physiology, and taxonomy of haloalkaliphilic microorganisms. In *Polyextremophiles-organisms living under multiple forms of stress*. Springer, Dordrecht, pp. 103-119.

Oren, A. (2020). The microbiology of red brines. *Advances in Applied Microbiology*, 113, 57-110. DOI: 10.1016/bs.aambs.2020.07.003.

Oren, A., Ventosa, A., & Grant, W.D. (1997). Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(1), 233-238. DOI: 10.1099/00207713-47-1-233.

Oren, A., Ventosa, A., & Kamekura, M. (2017). Halobacteria. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust, Chichester, pp. 1-5.

Ormanci, H.B., & Colakoglu, F.A. (2015). Nutritional and sensory properties of salted fish product, *lakerda*. *Cogent Food & Agriculture*, 1(1), 1-13. DOI: 10.1080/23311932.2015.1008348.

Özogul, Y., Özogul, F., & Alagoz, S. (2007). Fatty acid profiles and fat contents of commercially important seawater and freshwater fish species of Turkey: A comparative study. *Food Chemistry*, 103(1), 217-223. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.08.009.

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, V.T., Singh, D., & Mohan, R. (2000). Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2), 135-152. DOI: 10.1042/ba19990073.

Pandey, A., Soccol, C.R., Leo, J.A.R., & Nigam, P. (2001). Solid state fermentation in biotechnology. New Delhi, Asiatech Publishers Inc., pp. 221-230.

Pandey, S., & Singh, S. (2012). Organic solvent tolerance of an α-amylase from haloalkaliphilic bacteria as a function of pH, temperature, and salt concentrations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(7), 1747-1757.

Pandey, S., Sharma, A.K., Solanki, K.P., & Singh, S.T. (2018). Catalysis and stability of an extracellular α-amylase from a haloalkaliphilic bacterium as a function of the organic 149

solvents at different pH, salt concentrations and temperatures. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 47(1), 240-248.

Panneerselvam, T., & Elavarasi, S. (2015). Isolation of α-amylase producing *Bacillus subtilis* from soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(2), 543-552.

Papke, R.T. (2015). Preface to the proceedings of Halophiles 2013. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1-5. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00341.

Park, J. S., & Simpson, A.G.B. (2015). Diversity of heterotrophicprotists from extremely hypersaline habitats. *Protist*, 166(4), 422-437. DOI: 10.1016/j.protis.2015.06.001.

Paul, J.S., Lall, B.M., Jadhav, S.K., & Tiwari, K.L. (2017). Parameter's optimization and kinetics study of α-amylase enzyme of *Bacillus* sp. MB6 isolated from vegetable waste. *Process Biochemistry*, 52,123-129. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.10.005.

Peck, M.A., Alheit, J., Bertrand, A., Catalán, I.A., Garrido, S., Moyano, M., Rykaczewski, R., Takasuka, A., & Van der Lingen, C.D. (2021). Small pelagic fish in the new millennium: A bottom-up view of global research effort. *Progress in Oceanography*, 191, 1-89. DOI: 10.1016/j.pocean.2020.102494.

Perez, S., Barañano, S., Murialdo, S., & Yeannes, M.I. (2016). In *Modificación de la flora microbiológica durante el salado de anchoíta (Engraulis anchoita)*. Proceedings of the Food Innova 2014, pp. 455-464.

Perez, S., Czerner, M., Patat, M.L., Zaritzky, N.E., Murialdo, S.E., & Yeannes, M.I. (2018). Monitoring the characteristics of cultivable halophilic microbial community during salted-ripened anchovy (*Engraulis anchoita*) production. *International Journal of Food Microbiology*, 286(8), 179-189. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.013.

Perez, S., Murialdo, S. E., Ameztoy, I. M., Zaritzky, N. E., & Yeannes, M. I. (2020). New insights into halophilic prokaryotes isolated from salting-ripening anchovies (*Engraulis anchoita*) process focused on histamine-degrading strains. *Extremophiles*, 24(5), 787-796. DOI: 10.1007/s00792-020-01194-w.

Perez, S., Corti-Monzón, G., Yeannes, M. I., Zaritzky, N. E., Villegas-Plazas, M., Junca,
H., & Murialdo, S. E. (2021). Assembly of hyperhalophilic complex consortia of isolates
from anchovy ripening attaining histamine degradation and their microbiome configuration. *LWT*, 142, 1-7. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.111010.

Perez-Pomares, F., Bautista, V., Ferrer, J., Pire, C., Marhuenda-Egea, F.C., & Bonete, M.J. (2003). Alpha-Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*, 7(4), 299-306. DOI: 10.1007/s00792-003-0327-6.

Perez-Villarreal, B., & Pozo, R. (1992). Ripening of the salted *anchovy (Engraulis encrasicholus)*: Study of the sensory, biochemical and microbiological aspects. In *Huss, H.H., Jakobsen, M., & Liston, J. (Eds.), Quality Assurance in the Fish Industry*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 157-167.

Perrier, R., Auffret van der Kemp, T., & Zonszain, F. (1997). Expériences faciles et moins faciles en sciences microbiologique collection : *Biosciences et techniques*. Ed. Doin, Paris, France, 476p.

Peyton, B.M., Mormille, M.R., Alva, V., Oie, C., Roberto, F., Apel, W.A., & Oren, A. (2004). Biotransformation of toxic organic and inorganic contaminants by halophilic bacteria In *Ventosa, A. (Ed.), Halophilic Microorganisms*. Springer, Berlin, pp. 315-331.

Phelps, T., Angus, F., Clegg, S., Kilcast, D., Narain, C., & Ridder, C. (2006). Sensory issues in salt reduction. *Food Quality and Preference*, 17(7-8), 633-634.

Pigott, G.M., & Tucker, B.W. (1987). Science opens new horizons for marine lipids in human nutrition. *Food Reviews International*, 3(1/2), 105-138. DOI: 10.1080/87559128709540809.

Pinjari, A.B., & Kotari, V. (2018). Characterization of extracellular amylase from *Bacillus* sp. strain RU1. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 6(3), 29-34. DOI: 10.7324/JABB.2018.60305.

Pons-Sánchez-Cascado, S., Veciana-Nogués, M.T., & Vidal-Carou, M.C. (2003). Effect of delayed gutting on biogenic amine contents during ripening of European anchovies. *European Food Research and Technology*, 216(6), 489-493. DOI: 10.1007/s00217-003-0695-2.

Pons-Sánchez-Cascado, S., Veciana-Nogués, M.T., Bover-Cid, S., Mariné-Font, A., & Vidal-Carou, M.C. (2005). Volatile and biogenic amines, microbiological counts, and bacterial amino acid decarboxylase activity through the salt ripening process of anchovies (*Engraulis encrasicholus*). *Journal of Food Protection*, 68(8), 1683-1689. DOI: 10.4315/0362-028x-68.8.1683.

Pons-Sánchez-Cascado, S., Vidal-Carou, M.C., Nunes, M.L., & Veciana-Nogués, M.T. (2006). Sensory analysis to assess the freshness of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicholus*) stored in ice. *Food Control*, 17(7), 564-569. DOI: 10.1016/j.foodcont.2005.02.016.

Popinako, A., Antonov, M., Tikhonov, A., Tikhonova, T., & Popov, V. (2017). Structural adaptations of octaheme nitrite reductases from haloalkaliphilic Thioalkalivibrio bacteria to alkaline pH and high salinity. *PLOS ONE*, 12(5), 1-17. DOI: 10.1371/journal.pone.0177392.

Prakash, B., Vidyasagar, M., Madhukumar, M.S., Muralikrishna, G., & Sreeramulu, K. (2009). Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkalistable α-amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochemistry*, 44(2), 210-215. DOI: 10.1016/j.procbio.2008.10.013.

Prato, E., & Biandolino, F. (2012). Total lipid content and fatty acid composition of commercially important fish species from the Mediterranean, Mar Grande Sea. *Food Chemistry*, 131(4), 1233-1239. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.09.110.

Prescott, L.M., Harley, J.P., & Klein, D.A. (1996). Antimicrobial chemotherapy. In *Microbiology*. 3th Ed.WCB Publishers, London, pp. 657-671.

Purohit, M.K., & Singh, S.P. (2011). Comparative analysis of enzymatic stability and amino acid sequences of thermostable alkaline proteases from two haloalkaliphilic bacteria isolated from Coastal region of Gujarat, India. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(1), 103-112. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.04.001.

Purslow, P.P. (2014). New developments on the role of intramuscular connective tissue in meat toughness. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5(1), 133-153. DOI: 10.1146/annurev-food-030212-182628.

Qin, Y., Huang, Z., & Liu, Z. (2014). A novel cold-active and salt-tolerant α -amylase from marine bacterium *Zunongwangia profunda*: molecular cloning, heterologous expression and biochemical characterization. *Extremophiles*, 18(2), 271-281. DOI: 10.1007/s00792-013-0614-9.

Rajan, L.A., Joseph, T.C., Thampuran, N., & James, R. (2010). Studies on the microbial diversity of salted fishes under aerobic conditions. *Microbiology Research*, 1(1), 28-31. DOI: 10.4081/mr.2010.e5.

Ramírez, D.N., Serrano, J.A., & Sandoval, H. (2004). Las bacterias halofilas y sus aplicaciones biotecnologicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiolgía*, 24(1-2), 1-23.

Rana, N., Verma, N., Vaidya, D., & Dipta, B. (2017). Production of amylase from *Bacillus thuringiensis* J2 using apple pomace as substrate in solid state fermentation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 3465-3474. DOI: 10.20546/ijcmas.2017.608.415.

Rao, J.L., & Sathyanarayana, U.M. (2003). Enhanced secretion and low temperature stabilization of a hyperthermostable and Ca²⁺-independent alpha- amylase of *Geobacillus thermoleovorans* by surfactants. *Letters in Applied Microbiology*, 36(4), 191-196. DOI: 10.1046/j.1472-765x.2003.01283.x.

Raplong, H.H., Odeleye, P.O., Hammuel, C., Idoko, M.O., Asanato, J.I., & Odeke, E.H. (2014). Production of alpha amylase by *Bacillus cereus* in submerged fermentation. *Aceh International Journal of Science and Technology*, 3(3), 124-130. DOI: 10.13170/aijst.3.3.1592.

Regenstein, J.M., & Regenstein, C.E. (1991). Introduction to fish technology. An osprey book. Van Nostrand Reinhold, New York. 269p.

Rehman, A. (2019). Isolation, optimization, partial purification and characterization of amylase produced by indigenously isolated *Bacillus* AS2 strain. Doctorate thesis. University of Karachi, Karachi, Pakistan, 364p.

Renieri, E.A., Alegakis, A.K., Kiriakakis, M., Vinceti, M., Ozcagli, E., Wilks, M.F., & Tsatsakis, A.M. (2014). Cd, Pb and Hg biomonitoring in fish of the mediterranean region and risk estimations on fish consumption. *Toxics*, 2(3), 417-442. DOI: 10.3390/toxics2030417.

Richardson, K., Bendtsen, J., Christensen, J.T., Adjou, M., Moltke Lyngsgaard, M., Hilligsøe, K.M., Pedersen, J.B., Vang, T., & Holtegaard Nielsen, M. (2014). Localised mixing and heterogeneity in the plankton food web in a frontal region of the Sargasso Sea: implications for eel early life history? *Marine Ecology Progress Series*, 504, 91-107. DOI: 10.3354/meps10766.

Rodríguez-Jerez, J.J., Lopez-Sabater, E.I., Roig-Sagues, A.X., & Mora-Ventura, M.T. (1993). Evolution of histidine decarboxylase bacterial groups during the ripening of Spanish semi-preserved anchovies. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, 40(8), 533-543. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1993.tb00174.x.

Roh, S.W., Kim, K.H., Nam, Y.D., Chang, H.W., Park, E.J., & Bae, J.W. (2009). Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using bar coded pyrosequencing. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 4(1), 1-16. DOI: 10.1038/ismej.2009.83.

Rohban, R., Amoozegar, M.A., & Ventosa, A. (2009). Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(3), 333-340. DOI: 10.1007/s10295-008-0500-0.

Roldán, H., Barassi, C., & Trucco, R. (1985). Increase on free fatty acids during ripening of anchovies (*E. anchoita*). *Journal of Food Technology*, 20, 581-585.

Roohi, R., Mohammed, K., & Saima, S. (2013). Cold-active detergent-stable extracellular α -amylase from *Bacillus cereus* GA6: biochemical characteristics and its perspectives in laundry detergent formulation. *Journal of Biochemical Technology*, 4(4), 636-644.

Roses, R.P., & Guerra, N.P. (2009). Optimization of amylase production by *Aspergillus niger*in solid-state fermentation using sugarcane bagasse as solid support material. *World Journal of Microbiology* and *Biotechnology*, 25(11), 1929-1939. DOI: 10.1007/s11274-009-0091-6.

Rothschild, L.J., & Mancinelli, R.L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101. DOI: 10.1038/35059215.

Ryan, S.M., Fitzgerald, G.F., & Van Sinderen, D. (2006). Screening and identification of starch-amylopectin and pullulan-degrading activities in bifidobacterial strains. *Applied* and *Environmental Microbiology*, 72(8), 5289-5296. DOI: 10.1128/AEM.00257-06.

Saccò, M., White, N.E., Harrod, C., Salazar, G., Aguilar, P., Cubillos, C.F., Meredith, K., Baxter, B.K., Oren, A., Anufriieva, E., Shadrin, N., Marambio-Alfaro, Y., Bravo-Naranjo, V., & Allentoft, M.E. (2021). Salt to conserve: A review on the ecology and preservation of hypersaline ecosystems. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 96(6), 1-23. DOI: 10.1111/brv.12780.

Saglik, S., & Imre, S. (2001). ω3-Fatty Acids in Some Fish Species from Turkey. *Journal of Food Science*, 66(2), 210-212. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2001.tb11318.x.

Saha, K., Maity, S., Roy, S., Pahan, K., Pathak, R., Majumdar, S., & Gupta, S. (2014). Optimization of amylase production from *B. Amyloliquefaciens* (MTCC 1270) using solid state fermentation. *International Journal of Microbiology*, 2014, 1-7. DOI: 10.1155/2014/764046.

Sahoo, S., Roy, S., & Maiti, S. (2016). A high salt stable α-amylase by *Bacillus* sp. MRS6 isolated from municipal solid waste; purification, characterization and solid state fermentation. *Enzyme Engineering*, 5(3), 1-8. DOI: 10.4172/2329-6674.1000152.

Salman, T., Kamal, M., Ahmed, M., Siddiqa, S.M., Khan, R.A., & Hassan, A. (2016). Medium optimization for the production of amylase by *Bacillus subtilis* RM16 in Shake-flask fermentation. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(2), 439-444.

Salva, T., & Moraes, I. (1995). Effect of the carbon source on alpha-amylase production by *Bacillus subtilis* BA-04. *Revista de Microbiologia*, 26, 46-51.

Sampels, S. (2015). The effects of processing technologies and preparation on the final quality of fish products. *Trends in Food Science & Technology*, 44(2), 131-146. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.04.003.

Sánchez-Porro, C., Martin, S., Mellado, E., & Ventosa, A. (2003). Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 295-300. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01834.x.

Sandstedt, R.M., Kneen, E., & Blish, M.J. (1939). A standardized Wohlge-muth procedure for alpha-amylase activity. *Cereal Chemistry*, 16, 712-723.

Santiago, P.A., & Maurizio, U. (2002). Effect of brine pre-treatment of frozen horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research Technology*, 215(2), 91-95. DOI: 10.1007/s00217-002-0530-1.

Santorelli, M., Maurelli, L., Pocsfalvi, G., Fiume, I., Squillaci, G., Cara, F.L., Del Monaco, G., & Morana, A. (2016). Isolation and characterisation of a novel α-amylase from the extreme haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 174-184. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.07.001.

Sarkar, S.K., Cabral, H., Chatterjee, M., Cardoso, I., Bhattacharya, A.K., Satpathy, K.K., & Alam, M.A. (2008). Biomonitoring of heavy metals using the bivalve *Molluscs* in Sunderban mangrove wetland, northeast coast of Bay of Bengal (India): possible risks to human health. *Clean-Soil Air Water*, 36(2), 187-194. DOI: 10.1002/clen.200700027.

Satomi, M., La Duc, M.T., & Venkateswaran, K. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1735-1740. DOI: 10.1099/ijs.0.64189-0.

Saxena, R., & Singh, R. (2011). Amylase production by solid-state fermentation of agroindustrial wastes using *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), 1334-1342. DOI: 10.1590/S1517-838220110004000014.

Schaeffer, A.B., & Fulton, M.D. (1933). A simplified method of staining endospores. *Science*, 77(1990), 194. DOI: 10.1126/science.77.1990.194.

Schallmey, M., Singh, A., & Ward, O.P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50(1), 1-17. DOI: 10.1139/w03-076.

Sekar, A., Packyam, M., & Kim, K. (2016). Halophile isolation to produce halophilic protease, protease production and testing crude protease as a detergent ingredient. *African Journal of Microbiology Research*, 10(36), 1540-1547. DOI: 10.5897/AJMR2016.8193.

Selmi, S., Bouriga, N., Cherif, M., Toujani, M., & Trabelsi, M. (2010). Effects of drying process on biochemical and microbiological quality of silverside (fish) *Atherina lagunae*. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(6), 1161-1168. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02249.x.

Sen, I., Shandil, A., & Shrivastava, V.S. (2011). Study for Determination of Heavy Metals in Fish Species of the River Yamuna (Delhi) by Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectroscopy (ICP-OES). *Advances in Applied Science Research*, 2(2), 161-166. Setati, M.E. (2010). Diversity and industrial potential of hydrolase producing halophilic/halotolerant eubacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(11), 1555-1560. DOI: 10.5897/AJB10.051.

Shafiei, M., Ziaee, A.A., & Amoozegar, M.A. (2010). Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting, and halophilic α -amylase from a moderately halophilic bacterium, *Nesterenkonia* sp. strain F. *Process Biochem*istry, 45(5), 694-699. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.01.003.

Shafiei, M., Ziaee, A. A., & Amoozegar, M. A. (2011). Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α -amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 38(2), 275-281. DOI: 10.1007/s10295-010-0770-1.

Shafiei, M., Ziaee, A. A., & Amoozegar, M. A. (2012). Purification and characterization of a halophilic α-amylase with increased activity in the presence of organic solvents from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *Extremophiles*, 16(4), 627-635. DOI: 10.1007/s00792-012-0462-z.

Sharma, A., & Satyanarayana, T. (2013). Microbial acid-stable α-amylases: characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*, 48(2), 201-211. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.12.018.

Sharma, N., Vamil, R., Ahmad, S., & Agarwal, R. (2012). Effect of different carbon and nitrogen sources on α-amylase production from *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(4), 1161-1163.

Sharma, P.K., & Chand, D. (2012). *Pseudomonas* sp. xylanase for clarification of Mausambi and Orange fruit juice. *International Journal of Advancements in Research and Technology*, 1(2), 106-108.

Shih, N.J., & Labbé, R. G. (1995). Purification and characterization of an extracellular αamylase from *Clostridium perfringens* type A. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(5), 1776-1779. DOI: 10.1128/aem.61.5.1776-1779.1995.

Shirazian, P., Asad, S., & Amoozegar, M.A. (2016). The potential of halophilic and halotolerant bacteria for the production of antineoplastic enzymes: L-asparaginase and L-glutaminase. *EXCLI Journal*, 15, 268-279. DOI: 10.17179/excli2016-146.

Shiriskar, D.A., Khedkar, G.D., & Sudhakara, N.S. (2010a). Preparation of pickled products from anchovies (*Stolephorus* sp.) and studies on quality changes during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(s1), 176-190. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2008.00332.x.

Shiriskar, D.A., Khedkar, G.D., & Sudhakara, N.S. (2010b). Preparation of boiled and dried products from anchovies (*Stolephorus* sp.) and studies on quality changes during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34(s1), 73-86. DOI: 10.1111/j.1745-4549.2008.00280.x.

Siglioccolo, A., Paiardini, A., Piscitelli, M., & Pascarella, S. (2011). Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology*, 11, 1-12. DOI: 10.1186/1472-6807-11-50.

Sigurgísladóttir, S., Konraosdottir, M., Jonsson, A., Kristjansson, J.K., & Matthiasson, E. (1993). Lipase activity of thermophilic bacteria from Icelandic hot springs. *Biotechnology Letters*, 15(4), 361-366. DOI: 10.1007/BF00128277.

Simair, A.A., Qureshi, A.S., Khushk, I., Ali, C.H., Lashari, S., Bhutto, M.A., Mangrio, G.S., & Lu, C. (2017). Production and partial characterization of α-amylase enzyme from *Bacillus* sp. BCC 01-50 and potential applications. *BioMed Research International*, 2017, 1-9. DOI: 10.1155/2017/9173040.

Šimat, V., & Bogdanović, T. (2012). Seasonal changes in proximate composition of anchovy (*Engraulis encrasicolus*, L.) from the central Adriatic. *Acta Adriatica (0001-5113)*, 53(1), 125-132.

Sindhu, R., Binod, P., & Pandey, A. (2017). α-amylases. In Current Developments in Biotechnology and Bioengineering, Production, Isolation and Purification of Industrial Products, pp. 3-24. DOI: 10.1016/b978-0-444-63662-1.00.

Singh, P., Jain, K., Desai, C., Tiwari, O., & Madamwar, D. (2019). Microbial community dynamics of extremophiles/extreme environment. In *Das, S., & Dash H.R. (Eds.), Microbial Diversity in the Genomic Era.* San Dieg, CA: Academic Press, pp. 323-332. DOI: 10.1016/b978-0-12-814849-5.00018-6.

Sinha, R., & Khare, S.K. (2013). Characterization of detergent compatible protease of a halophilic *Bacillus* sp. EMB9: differential role of metal ions instability and activity. *Bioresource Technology*, 145, 357-361. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.11.024.

Sinha, R., & Khare, S. K. (2014). Protective role of salt in catalysis and maintaining structure of halophilic proteins against denaturation. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1-6. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00165.

Siroosi, M., Amoozegar, M.A., Khajeh, K., Fazeli, M., & Rezaei, M.H. (2014). Purification and characterization of a novel extracellular halophilic and organic solventtolerant amylopullulanase from the haloarchaeon, *Halorubrum* sp. strain Ha25. *Extremophiles*, 18(1), 25-33. DOI: 10.1007/s00792-013-0589-6. Siroosi, M., Borujeni, F.B., Amoozegar, M.A., Babavalian, H., & Hassanshahian, M. (2021). Halophilic amylase production and purification from *Haloarcula* sp. Strain D61. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(1), 7382-7392. DOI: 10.33263/BRIAC111.73827392.

Sivakumar, T., Ramasubramanian, V., Shankar, T., Vijayabaskar, P., & Anandapandian, K. (2011). Screening of keratinolytic bacteria *Bacillus cereus* from the feather dumping soil of Sivakasi. *Journal of Basic and Applied Biology*, 5(1-2), 305-314.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., & Pandey, A. (2006). α-amylases from microbial sources-An overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 173-184.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Nampoothiri, K.M., Soccol, C.R., & Pandey, A. (2007). Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid state fermentation. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66(8), 621-626.

Skåra, T., Axelsson, L., Stefánsson, G., Ekstrand, B., & Hagen, H. (2015). Fermented and ripened fish products in the northern European countries. *Journal of Ethnic Foods*, 1(2), 18-24. DOI:10.1016/j.jef.2015.02.004.

Skibsted, L.H., Mikkelsen, A., & Bertelsen, G. (1998). Lipid-derived off-flavours in meat. In *Shahidi*, *F. (Ed.), Flavor of Meat, Meat Products and Seafoods*. Blackie Academic & Professional, London, UK, pp. 216-256.

Smith, G., Hanson, S., & Hole, M. (1988). Lipid oxidation and associated browning in Indonesian salted-dried catfish (*Arius thallasinus*). Fish Technical News. 11p.

Smits, J.P., Rinzema, J., Tramper, H., Van, M., & Knol, W. (1996). Solid state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QMQ414: Substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. *Applied Microbiology and*

Biotechnology, 46(5-6), 489-496. DOI: 10.1007/s002530050849.

Soares, M.M., Silva, R.D., & Gomes, E. (1999). Screening of bacterial strains for pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Revista de Microbiologia*, 30(4), 299-303. DOI: 10.1590/S0001-37141999000400002.

Sofoulaki, K., Kalantzi, I., Machias, A., Mastoraki, M., Chatzifotis, S., Mylona, K., Pergantis, S.A., & Tsapakis, M. (2018). Metals and elements in sardine and anchovy: Species specific differences and correlations with proximate composition and size. *Science of the Total Environment*, 645, 329-338. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.133.

Song, J., Wang, Y., Song, Y., Zhao, B., Wang, H., Zhou, S., Kong, D., Guo. X., Li, Y., He,
M., Ma, K., Ruan, Z., &Yan, Y. (2017). *Brevibacillus halotolerans* sp. nov., isolated from 158

saline soil of a paddy field. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 67(4), 772-777. DOI: 10.1099/ijsem.0.001579.

Soni, S.K., Kaur A., & Gupta, J.K. (2003). A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. *Process Biochemistry*, 39(2), 185-192. DOI: 10.1016/S0032-9592(03)00058-X.

Souza, T.A.C.B., Okamoto, D.N., Ruiz, D.M., Oliveira, L.C.G., Kondo, M.Y., Tersario, I.L.S., Juliano, L., De Castro, R.E., Gouvea, I.E., & Murakami, M.T. (2012). Correlation between catalysis and tertiary structure arrangement in an archaeal halophilic subtilase. *Biochimie*, 94(3), 798-805. DOI: 10.1016/j.biochi.2011.11.011.

Srimathi, S., Jayaraman, G., Feller, G., Danielsson, B., & Narayanan, P.R. (2007). Intrinsic halotolerance of the psychrophilic alpha-amylase from *Pseudoalteromonas haloplanktis*. *Extremophiles*, 11(3), 505-515. DOI: 10.1007/s00792-007-0062-5.

Stefánsson, G., & Gudmundsdttir, G. (1995). Free amino acids and their relationship to taste in (salt) ripened pellagic fish species. Icelandic Fisheries Laboratory. Rf Report 1991. Iceland. 9p.

Straathof, J.J.A., & Adlercreutz, P. (2014). How to get the biocatalyst, in: *Applied Biocatalyst*. 2nd Ed., CRC Press, pp. 181-182.

Subov, N.N. (1931). Oceanographical Tables. Moscow: USSR Oceanographic Institute Hydrometeorological Commission.

Suganthi, C., Mageswari, A., Karthikeyan, S., & Gothandam, K.M. (2015). Insight on biochemical characteristics of thermotolerant amylase isolated from extremophile bacteria *Bacillus vallismortis* TD6 (HQ992818). *Microbiology*, 84(2), 210-218. DOI: 10.1134/S0026261715020162.

Talon, R., & Leroy, S. (2014). Fermented meat products and the role of starter cultures. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 1, 870-874. DOI: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00116-6.

Tanaka, A., & Hoshino, E. (2002). Thermodynamic and activation parameters for the hydrolysis of amylose with Bacillus α -amylases in a diluted anionic surfactant solution. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(5), 485-490. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80096-2.

Tanasupawat, S. Pakdeeto, A., Namwong, S., Thawai, C., Kudo, T., & Itoh, T. (2006). *Lentibacillus halophilus sp. nov.*, from fish sauce in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(8), 1859-1863. DOI:10.1099/ijs.0.63997-0. Tang, S.K., Wang, Y., Klenk, H.P., Shi, R., Lou, K., Zhang, Y.J., Chen, C., Ruan, J.S., & Li, W.J. (2011). Actinopolyspora alba sp. nov. and Actinopolyspora erythraea sp. nov., isolated from a salt field, and reclassification of Actinopolyspora iraqiensis Ruan et al. 1994 as a heterotypic synonym of Saccharomonospora halophila. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 61(7), 1693-1698. DOI: 10.1099/ijs.0.022319-0.

Tapingkae, W., Tanasupawat, S., Itoh, T., Parkin, K.L., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Valyasevi, R. (2008). *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(10), 2378-2383. DOI: 10.1099/ijs.0.65644-0.

Tapingkae, W., Tanasupawat, S., Parkin, K.L., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2010). Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt-fermented fishery products. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(2), 92-99. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.10.011.

Tashyrev, O., Hovorukha, V., Havryliuk, O., Sioma, I., Gladka, G., Kalinichenko, O., Włodarczyk, P., Suszanowicz, D., Zhuk, H., & Ivanov, Y. (2022). Spatial succession for degradation of solid multicomponent food waste and purification of toxic leachate with the obtaining of biohydrogen and biomethane. *Energies*, 15(3), 1-14. DOI: 10.3390/en15030911.

Teodoro, C.E.D., & Martins, M.L.L. (2000). Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 298-302.

Thapa, S., Li, H., OHair, J., Bhatti, S., Chen, F.C., Al Nasr, K., Johnson, T., & Zhou S. (2019). Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. *Molecular Biotechnology*, 61(8), 579-601. DOI: 10.1007/s12033-019-00187-1.

Tilami, S.K., & Sampels, S. (2017). Nutritional value of fish: Lipids, proteins, vitamins, and minerals. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 26(2), 243-253. DOI: 10.1080/23308249.2017.1399104.

Tindall, B.J. (1992). The family Halobacteriaceae. In Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder W., & Schleifer, K.H (Eds.), The Prokaryotes. A Handbook of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. 2nd Ed.V1, Springer, New York, pp. 768-808.

Tiwari, S., Shukla, N., Mishra, P., & Gaur, R. (2014). Enhanced production and characterization of a solvent stable amylase from solvent tolerant *Bacillus tequilensis* RG-01: Thermostable and surfactant resistant. *The Scientific World Journal*, 2014(13), 1-11. DOI: 10.1155/2014/972763.
Tokunaga, H., Ishibashi, M., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2004). Highly efficient renaturation of β-lactamase isolated from moderately halophilic bacteria. *FEBS letters*, 558(1-3), 7-12. DOI: 10.1016/S0014-5793(03)01508-4.

Toldrá, F. (2006a). Meat: chemistry and biochemistry. In *Hui, Y.H., Culbertson, J.D., Duncan, S., Guerrero-Legarreta, I., Li-Chan, E.C.Y., Ma, C.Y., Manley, C.H., McMeekin, T.A., Nip, W.K., Nollet, L.M.L., Rahman, M.S., Toldrá, F., & Xiong, Y.L. (Eds.), Handbook of Food Science, Technology and Engineering.* V.1. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-28.

Toldrá, F. (2006b). Biochemical proteolysis basis for improved processing of dry-cured meats. In *Nollet, L.M.L., & Toldrá, F. (Eds.), Advanced Technologies for Meat Processing.* CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 329-351.

Toldrá, F., & Flores, M. (1998). The role of muscle proteases and lipases in flavor development during the processing of dry-cured ham. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38(4), 331-352. DOI: 10.1080/10408699891274237.

Tonkova, A., Manolov, R., & Dobreva, E. (1993). Thermostable α-amylase from depressed *Bacillus licheniformis* produced in high yields from glucose. *Process Biochemistry*, 28, 539-542.

Torreblanca, M., Rodriguez Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M., & Kates, M. (1986). Classification of non halkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarcula* gen.nov. and *Halopherax* gen.nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 8(1-2), 89-99. DOI: 10.1016/S0723-2020(86)80155-2.

Torregrosa-Crespo, J., Galiana, C.P., & Martínez-Espinosa, R.M. (2017). Biocompounds from haloarchaea and their uses in biotechnology. In Sghaier, H., Najjari, A., & Ghedira, K. (Eds.), Archaea-New Biocatalysts, Novel Pharmaceuticals and Various Biotechnological Applications, pp. 63-82. DOI: 10.5772/intechopen.69944.

Trabelsi, S., Ben Mabrouk, S., Kriaa, M., Ameri, R., Sahnoun, M., Mezghani, M., & Bejar, S. (2019). The optimized production, purification, characterization, and application in the bread making industry of three acid-stable alpha-amylases isoforms from a new isolated *Bacillus subtilis* strain US586. *Journal of Food Biochemistry*, 43(8), 1-13. DOI: 10.1111/jfbc.12826.

Triqui, R., & Reineccius, G.A. (1995). Flavor development in the ripening of anchovy (*Engraulis encrasicholus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 453-458. DOI: 10.1021/jf00050a037.

Triqui, R., & Zouine, K. (1999). Sensory and instrumental assessments of the ripening process of anchovy (*Engraulis encrasicholus*). *LWT- Food Science and Technology*, 32(4), 203-207. DOI: 10.1006/fstl.1998.0526.

Tuara, P. (1997). Practical methods for preserving seafoods: Salting and drying (A Training Manual). Women's fisheries development section south pacific Commission Noumea, New Caledonia. Pasifika Communications Ltd, Suva, Fiji, pp 1-43.

Tunali, S. (1984). Fish salting methods and techniques. Ege University Fisheries Faculty. Journal of Fisheries, 1(4), 38-45.

Turan, H., & Erkoyuncu, I. (2012). Salting Technology in Fish Processing. In *Bhat, R., Alias, A.K., & Paliyath, G. (Eds.), Progress in Food Preservation*. 1st Ed. John Wiley & Sons, Ltd., pp. 297-313. DOI: 10.1002/9781119962045.ch14.

Unakal, C., Kallur, R. I., & Kaliwal, B. B. (2012). Production of α-amylase using banana waste by *Bacillus subtilis* under solid state fermentation. *European Journal of Experimental Biology*, 2(4), 1044-1052.

Uzyol, K. S., Akbulut, B. S., Denizci, A. A., & Kazan, D. (2012). Thermostable alphaamylase from moderately halophilic *Halomonas* sp. AAD21. *Turkish Journal of Biology*, 36, 327-338. DOI: 10.3906/biy-1106-7.

Vaikundamoorthya, R., Rajendrana, R., Selvaraju, A., Moorthy, K., & Perumal, S. (2018). Development of thermostable amylase enzyme from *Bacillus cereus* for potential antibiofilm activity. *Bioorganic Chemistry*, 77, 494-506. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.02.014.

Vengadaramana, A., Balakumar, S., & Arasaratnam, V. (2012). Production and Optimization of α-amylase by *Bacillus licheniformis* ATCC 6346 in Lab Bench-Scale Fermenter. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 2(1), 190-211.

Ventosa, A., Nieto, J.J., & Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 504-544. DOI: 10.1128/MMBR.62.2.504-544.1998.

Ventosa, A., Oren, A., & Ma, Y. (2011). Halophiles and hypersaline environments: Current research and future trends. Springer Heidelberg Dordrecht London New York. DOI 10.1007/978-3-642-20198-1. 395p.

Ventosa, A., de la Haba, R.R., Sánchez-Porro, C., & Papke, R.T. (2015). Microbial diversity of hypersaline environments: A metagenomic approach. *Current Opinion in Microbiology*, 25, 80-87. DOI: 10.1016/j.mib.2015.05.002.

Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., & Indhumathi, J. (2009). Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus* spp. *World Journal of Chemistry*, 4(1), 89-91.

Vihinen, M., & Mantsala, P. (1990). Characterization of a thermostable *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12(4), 427-435. DOI: 10.1111/j.1470-8744.1990.tb00110.x.

Vijayan, M., Jothinathan, M.K.D., Murugesan, S.K., Rangasamy, N., Sankaran, G., Sathasivam, V., Prasanth, M., & Shanthini, T. (2015). Microbial production of amylase from cassava waste. *Research in Pharmacy*, *5*, 22-30.

Villar, M., Ruiz Holgado, A., Sanchez, J., Trucco, R., & Oliver, G. (1985). Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). *Applied and Environmental Microbiology*, 49(3), 664-666.

Vishnu, T.S., Soniyamby, A.R., Praveesh, B.V., & Hema, T.A. (2014). Production and optimization of extracellular amylase from soil receiving kitchen waste isolate *Bacillus* sp. VS
04. *World Applied Sciences Journal*, 29(7), 961-967. DOI: 10.5829/idosi.wasj.2014.29.07.8220.

Waditee-Sirisattha, R., Kageyama, H., & Takabe, T. (2016). Halophilic microorganism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiology*, 2(1), 42-54. DOI: 10.3934/microbiol.2016.1.42.

Wang, S., Jeyaseelan, J., Liu, Y., & Qin, W. (2016). Characterization and optimization of amylase production in WangLB, a high amylase-producing strain of *Bacillus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(1), 136-151. DOI: 10.1007/s12010-016-2089-5.

Wang, X., Kan, G., Ren, X., Yu, G., Shi, C., Xie, Q., Wen, H., & Betenbaugh, M. (2018). Molecular Cloning and characterization of a novel α-amylase from antarctic sea ice bacterium *Pseudoalteromonas* sp. M175 and its primary application in detergent. *BioMed Research International*, 2018, 1-16. DOI: 10.1155/2018/3258383.

Weinisch, L., Kühner, S., Roth, R., Grimm, M., Roth, T., Netz, D.J.A., Pierik, A.J., & Filker, S. (2018). Identification of osmoadaptive strategies in the halophile, heterotrophic ciliate *Schmidingerothrix salinarum*. *PLOS Biology*, 16(1), 1-29. DOI: 10.1371/journal.pbio.2003892.

Whitehead, P.J.P. (1985). Clupeoid fishes of the world (Suborder Clupeoidei): An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf herrings. Part1. *Chirocentridae*, *Clupeidae* and *Pristigasteridae*. FAO Fisheries Synopsis, 125(7), 1-303.

Wilfinger, W.W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), 474-481. DOI: 10.2144/97223st01.

Wu, X., Wang, Y., Tong, B., Chen, X., & Chen, J. (2018). Purification and biochemical characterization of a thermostable and acid-stable alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* B4-423. *International Journal of Biological Macromolecules*, 109, 329-337. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.004.

Xie, F., Quan, S., Liu, D., Ma, H., Li, F., Zhou, F., & Chen, G. (2014). Purification and characterization of a novel α-amylase from a newly isolated *Bacillus methylotrophicus* strain P11-2. *Process Biochemistry*, 49(1), 47-53. DOI: 10.1016/j.procbio.2013.09.025.

Xu, J., Xiong, P., & He, B. (2016). Advances in improving the performance of cellulase in ionic liquids for lignocelluloses biorefinery. *Bioresource Technology*, 200, 961-970. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.10.031.

Yachai, M., Tanasupawat, S., Itoh, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Valyasevi, R.
(2008). Halobacterium piscisalsi sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 58(9), 2136-2140. DOI: 10.1099/ijs.0.65592-0.

Yamaguchi, R., Tokunaga, H., Ishibashi, M., Arakawa, T., & Tokunaga, M. (2011). Saltdependent thermo-reversible α-amylase: cloning and characterization of halophilic α-amylase from moderately halophilic bacterium, *Kocuria varians. Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(3), 673-684. DOI: 10.1007/s00253-010-2882-y.

Yeannes, M.I. (1995). Histamina en productos pesqueros. In *Silvestre, A. (Ed.), Toxicología de los Alimentos*. Cap VII. Hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, pp. 30-45.

Yeannes, M.I. (1996). Implementing HACCP at fishery industry level in Argentina (Practical Experience Document N°10). In *Proceedings of the Seminar on HACCP Implementation and Training for Developing Countries Fishery Industries*. Pascagoula, MS: FAO/DANIDA/NMFS-NOAA. Pascagoula, MS, USA, Doc N°10. 15p.

Yeannes, M.I. (2003). Vida útil microbiológica en productos pesqueros preservados. In *Vida útil microbiológica,* Conference of the II Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos.

Yimer, D., & Tilahun, A. (2018). Microbial biotechnology review in microbial enzyme production methods, assay techniques and protein separation and rifications. *Journal of Nutritional Health and Food Engineering*, 8(1), 1-7. DOI: 10.15406/jnhfe.2018.08.00249.

Yoon, J.H., Kang, K.H., & Park, Y.H. (2002). *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2043-2048. DOI: 10.1099/00207713-52-6-2043.

Yoon, S.A., Ryu, S.I., Lee, S.B., & Moon, T.W. (2008). Purification and characterization of branching specificity of a novel extracellular amylolytic enzyme from marine hyperthermophilic *Rhodothermus marinus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(3), 457-464.

Yu, H.Y., & Li, X. (2014). Characterization of an organic solvent-tolerant thermostable glucoamylase from a halophilic isolate, *Halolactibacillus* sp. SK71 and its application in raw starch hydrolysis for bioethanol production. *Biotechnology Progress*, 30(6), 126261268. DOI: 10.1002/btpr.1978.

Zang, J., Xu, Y., Xia, W., & Regenstein, J.M. (2019). Quality, functionality, and microbiology of fermented fish: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(7), 1228-1242. DOI: 10.1080/10408398.2019.1565491.

Zgomba Maksimovic, A., Zunabovic-Pichler, M., Kos, I., Mayrhofer, S., Hulak, N., Domig, K.J., & Mrkonjic Fuka, M. (2018). Microbiological hazards and potential of spontaneously fermented game meat sausages: A focus on lactic acid bacteria diversity. *LWT*, 89, 418-426. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.11.017.

Zhang, Q., Han, Y., & Xiao, H. (2017). Microbial α-amylase: a biomolecular overview. *Process Biochemistry*. 53(12), 88-101.

Zhao, K., Xu, R., Zhang, Y., Tang, H., Zhou, C., Cao, A., Zhao, G., & Guo, H. (2017). Development of a novel compound microbial agent for degradation of kitchen waste. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 442-450. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.12.011.

Zlatanos, S., & Laskaridis, K. (2007). Seasonal variation in the fatty acid composition of three Mediterranean fish-sardine (*Sardina pilchardus*), anchovy (*Engraulis encrasicolus*) and picarel (*Spicaras maris*). *Food Chemistry*, 103(3), 725-728. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.09.013.



1. Préparation de l'empois d'amidon

Pour une « solution » à 10 g/L

- Peser 10 g d'amidon soluble et verser dans 100 mL d'eau distillée. Faire bouillir en mélangeant.
- Jeter ensuite ce mélange chaud dans 900 mL d'eau froide en remuant vivement.
 Remettez le tout à chauffer en remuant jusqu'à éclaircissement.

Lorsque vous préparez de l'amidon penser à remuer lentement durant TOUTE la période de chauffe. Dès que la solution commence à s'éclaircir, cessez le chauffage et laissez doucement refroidir. Sur une plaque électrique, le chauffage ne cesse pas d'un coup : la solution continue de s'éclaircir et vous pouvez flaconner une solution claire.

• Tester l'empois d'amidon : sur I₂ dilué la coloration est bleue intense.

2. Préparation des solutions salines

À 5% : on utilise 166.65 mL de stock de sel à 30% préalablement préparé et on complète le volume avec 833.3 mL d'eau distillée pour obtenir 11itre de la solution saline.

À 10% : on utilise 333.3 mL de stock de sel à 30% préalablement préparé et on complète le volume avec 666.7 mL d'eau distillée.

3. Préparation des solutions tampons

Préparation du tampon acétate 20 mM

Solutions de stock

A : Acide acétique 20 mM: 5.775 mL d'acide acétique glacial dans 500 mL de l'eau milli-Q;
B : Acétate de potassium 20 mM: dissoudre 9.81 g d'acétate de potassium dans 500 mL de l'eau milli-Q.

Tableau 5. Composition du tampon acide acétique (20 mM) / acétate de potassium (20 mM).

y pH	X
3.7 3.6	46.3
6.0 3.8	44.0
9.0 4.0	41.0
13.2 4.2	36.8
19.5 4.4	30.5
24.5 4.6	25.5
30.0 4.8	20.0
35.2 5.0	14.8
3 9.5 5.2	10.5
41.2 5.4	8.8
45.2 5.6	4.8

Mélanger x mL de la solution A avec y mL de la solution B selon le pH désiré et diluer avec de l'eau milli-Q jusqu'à 100 mL.

pН	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	pН	KH ₂ PO ₄	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O
	(g/L)	(g/L)		(g/L)	(g/L)
5.7	22.40	3.49	6.9	10.80	29.51
5.8	22.08	4.29	7.0	9.36	32.73
5.9	21.60	5.37	7.1	7.92	35.95
6.0	21.05	6.60	7.2	6.72	38.63
6.1	20.40	8.05	7.3	5.52	41.31
6.2	19.56	9.93	7.4	4.56	43.46
6.3	18.60	12.07	7.5	3.84	45.07
6.4	17.64	14.22	7.6	3.12	46.68
6.5	16.44	16.90	7.7	2.52	48.55
6.6	15.00	20.12	7.8	2.04	49.09
6.7	13.56	23.34	7.9	1.68	49.89
6.8	12.24	26.29	8.0	1.27	50.81

Tableau 6. Composition du tampon phosphate (20 mM).

Tableau 7. Composition du tampon glycine (20 mM) / NaOH (20 mM)*.

pН	NaOH (20 mM)
8.6	2.00
8.8	3.00
9.0	4.40
9.2	6.00
9.4	8.40
9.6	11.20
9.8	13.60
10.0	19.30
10.2	22.75

*: mélanger 25 mL d'une solution de glycine à 20 mM avec x mL d'une solution à 20 mM de NaOH selon le pH désiré et diluer avec de l'eau milli-Q jusqu'à 100 mL.

Annexe I

 Tableau 8. Milieux de culture utilisés pour la caractérisation physiologique et biochimique (Harley et Prescott, 2002).

Milieu	Citrate de Simmons pH (7.1 ± 0.2)	Clark et Lubs pH (7.5 ± 0.2)	Urée de Christensen pH (6.8 ± 0.2)	Mannitol- Mobilité pH (7.6 ± 0.2)	TSI (<i>Triple</i> Sugar Iron) pH (7.4 ± 0.2)	Möller exempt d'acides aminés pH (6.8 ± 0.2)	Eau peptonée pH (7.4 ± 0.2)
Constituant				Ouantités (% p/	v, v/v)		
Ethanol						0.1	
Citrate de sodium	0.1						
Citrate d'ammoniaque ferrique					0.003		
Bleu de bromothymol	0.008						
Bromocrésol pourpre						0.16 x 10 ⁻⁴	
Rouge de phénol			0.0012	0.004	0.0025		
MgSO ₄ .7H ₂ 0	0.1						
KH ₂ PO ₄			0.2				
K ₂ HPO ₄	0.1	0.5					
KNO3				0.1			
NH ₄ .H ₂ PO ₄	0.1						
Na ₂ SO ₃					0.03		
Glucose		0.5	0.1		0.1	0.1	
Saccharose					1		
Lactose					1		
Mannitol				0.75			
Peptone de caséine				1			
Urée			2.4				
Extrait de levure						0.3	0.5
Peptone		0.5	0.1		2		0.1
Extrait de bœuf					0.3		
Agar	1.5		2	0.35	1.2		
Eau distillée	100	100	100	100	100	100	100



Figure 4. Courbe d'étalonnage de glucose par la méthode de DNS.



Figure 5. Courbe d'étalonnage de BSA par la méthode de Bradford.

Tableau 9. Lecture de la galerie miniaturisée API 20E.

Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révélateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho- Nitro-Phényl- Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe	0	9
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Drnithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe	9	
	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe	9	9
<u>H₂S</u>	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Fe III	Lecture directe	9	
<u>URÉ</u>	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe	9	
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte	q	
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte	99	
LVP	Pyruvate de sodium	production d'acétoïne (3-hydroxybutanone		Lecture indirecte	9	
GEL	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe	0	
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		9
NO2-/N2	Nitrates (NO ₃ -)	Nitrate réductase		Lecture indirecte	9	

Annexe III

Isolats		Polysaco	charases		Prot	éases		Lipases		Nombre
_	Amylase	Pectinase	Cellulase	Xylanase	Caséinase	Gélatinase	Tween 20	Tween 80	Huile	d'enzymes
									d'olive	produit par
										chaque isolat
AC1*	+	+	+	-	-	+	-	+	+	6
AC 2	_	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AC3*	+	+	+	_	+	+	-	-	-	5
AC4	+	+	-	_	+	-	-	-	-	3
AC5	+	-	-	-	+	-	-	-	-	2
AC6	+	-	-	_	+	_	-	-	-	2
AC7	+	+	-	-	+		-	+	-	4
AC8	+	+	-	-	-	+	-	+	-	4
AC9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AC10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AC11	-	-	_	_	-	_	-	-	-	0
AC12*	+	+	+	-	+	+	-	-	-	5
AC13	+	+	-	_	-	_	-	+	-	3
AC14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AC15	-	-	-	_	-	_	-	-	-	0
AC16	-	+	-	_	-	-	-	-	-	1
AC17	-	-	-	_	-	-	-	-	-	0
AC18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AC19	-	-	+	-	+	-	-	-	-	2
AC20	-	-	-	_	+	_	-	-	-	1
AC21	-	+	+	-	+	-	-	-	+	4
$AC22^*$	+	+	+	-	+	-	-	+	+	6
AC23	+	+	_	_	-	+	-	-	-	3
AC24	+	-	_	-	-	_	-	-	-	1
AC25	+	-	-	-	+	-	-	-	+	3

 Tableau 17. Screening des activités hydrolytiques extracellulaires.

* : Isolat d'intérêt ; + : présence ; - : absence.

Annexe III

Isolats		Polysace	charases		Prot	éases		Lipases		Nombre
-	Amylase	Pectinase	Cellulase	Xylanase	Caséinase	Gélatinase	Tween 20	Tween 80	Huile d'olive	d'enzymes produit par chaque isolat
AC26	+	-	-	-	+	-	+	-	-	3
AC27	+	-	+	-	+	-	+	-	-	4
AC28	-	-	-	-	+	-	-	+	-	2
AC29	+	+	-	-	-	+	+	-	-	5
AC30	-	-	-	-	+	-	+	-	-	2
AC31	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1
AC32	-	-	-	-	+	_	+	-	-	2
AC33	+	-	+	_	-	+	-	-	-	4
AC34	-	_	_	_	-	+	+	+	-	2
AC35	+	-	-	_	-	-	+	+	-	4
AC36	-	_	_	_	-	_	-	_	-	0
AC37	-	-	+	_	+	-	-	-	-	2
AC38	-	-	-	_	+	-	+	-	+	3
AC39	-	-	-	_	+	-	+	+	-	3
AC40*	+	+	+	+	-	+	-	-	-	5
AC41	+	-	-	_	+	-	-	-	-	2
AC42	+	-	-	_	_	+	-	-	-	2
AC43	+	+	-	_	+	-	-	-	-	3
AC44	-	-	+	-	_	+	-	-	-	2
AC45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AC46	+	+	-	_	-	-	-	-	+	3
AC47	+	+	_	_	+	-	-	-	-	3
AC48*	+	+	+	+	+	+	-	-	+	7
AC49	+	-	+	_	+	-	-	-	-	3
AC50	-	-	-	_	-	-	-	-	-	0

Tableau 17. Se	creening des	activités hydro	lytiques ext	racellulaires ((suite).
----------------	--------------	-----------------	--------------	-----------------	----------

* : Isolat d'intérêt ; + : présence ; - : absence.

Annexe III

Isolats		Polysace	charases		Prot	éases		Lipases		Nombre
	Amylase	Pectinase	Cellulase	Xylanase	Caséinase	Gélatinase	Tween 20	Tween 80	Huile d'olive	d'enzymes produit par chaque isolat
AC51	-	-	-	-	+	+	-	-	-	2
AC52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AC53	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AC54	+	+	-	-	+	-	-	-	+	4
AC55	+	+	-	-	+	+	-	-	-	4
AC56	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
AC57	+	+	-	-	+	+	-	-	-	4
AC58	-	+	-	-	-	-	-	-	-	1
AC59	+	-	-	-	+	-	-	-	+	3
AC60	-	-	-	-	-	-	_	-	-	0
T.A	30	21	14	2	30	15	09	09	09	

Tableau 17. Screening des activités hydrolytiques extracellulaires (suite).

+ : présence ; - : absence ; T.A : Total de chaque activité.



T : Total ; T.A : Total des activités ; T.20 : Tween 20 ; T.80 : Tween 80 ; H.O : Huile d'olive.

Figure 7. Effectif des activités hydrolytiques extracellulaires.

Isolat	Concentration de l'ADN	A260/A280	A260/A230
	(ng/µL)		
AC1	17.5 ± 0.20	1.45 ± 0.1	0.79 ± 0.65
AC3	6.20 ± 0.50	1.55 ± 0.53	0.63 ± 0.35
AC12	12.2 ± 0.10	1.98 ± 0.20	1.19 ± 0.02
AC22	11.6 ± 0.34	1.51 ± 0.19	0.91 ±0.91
AC40	4.70 ± 0.32	1.36 ± 0.03	0.55 ± 0.50
AC48	22.8 ± 0.18	1.45 ± 0.17	0.71 ±0.33

Tableau 19. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADM

A: Absorbance.

Tableau 20. Espèces présentant les meilleures correspondances de similitude (100%) dans le Blast de l'ADNr 16S.

Souches	Espèces proches
AC1	B. cereus, B. albus, Bacillus sp., B. paranthracis, B.tropicus,
AC3	B.mojavensis, Bacillus sp., B.subtilis, B. safensis
AC12	B.flexus, Bacillus sp.
AC22	B. xiamenensis, B.mojavensis, B. halotolerans, B.subtilis, Bacillus sp.
AC40	non identifiée
AC48	B.subtilis, Bacillus sp.

Caractéristiques	AC1	B. cereus	B. albus (Liu	<i>B</i> .	B. tropicus
		(Logan et De	et al., 2017)	paranthracis	(Liu et <i>al</i> .,
		Vos, 2015)		(Liu et <i>al</i> .,	2017)
				2017)	
Gram	+	+	+	+	+
Oxidase	+	-	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-
ADH	-	d	+	+	+
Utilisation du Citrate	+	+	+	+	+
Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-
Production d'indole	-	-	-	-	-
Voges Proskaur (VP)	+	+	+	+	+
Rouge de méthyle (RM)	+	-			
Glucose	-	+	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-
Saccharose	-	d	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Amygdaline	-	-	-	-	-
Uréase	-	d	-	-	-
Nitrate Réductase	nd	d			
TDA (Tryptophane	+	-	-	-	-
DésAminase)					
Hydrolyse de l'amidon	+	+	+	nd	+
Hydrolyse de CMC	+	nd	nd	nd	+
Hydrolyse de la pectine	+	nd	nd	nd	nd
Hydrolyse du xylane	-	nd	nd	nd	nd
Hydrolyse de la caséine	-	+	+	+	+
Hydrolyse de la gélatiné	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'huile	+	nd	nd	nd	nd
d'olive					
Hydrolyse de Tween 80	+	-	nd	nd	nd
Hydrolyse de Tween 20	-	nd	nd	nd	nd

Tableau 21. Caractéristiques biochimiques de la souche AC1 et de ses espèces les plus proches.

+: positive ; - : négative ; d: des souches différentes donnent des réactions différentes ; nd: non déterminé.

Caractéristiques	AC3	B. subtilis	B. mojavensis	B. safensis
		(Logan et De Vos,	(Logan et De Vos,	(Satomi et al.,
		2015)	2015)	2006)
Gram	+	+	+	+
Oxidase	+	d	+	+
Catalase	+	+	+	+
ONPG	-	+	nd	+
LDC	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-
Utilisation du Citrate	_	+	+	+
Production d'H ₂ S	-	nd	-	-
Production d'indole	-	-	-	-
Voges Proskaur (VP)	+	+	+	+
Rouge de méthyle (RM)	-	-	nd	nd
Glucose	-	+	+	+
Arabinose	-	-	+	-
Melibiose	-	d	-	-
Saccharose	-	+	+	+
Rhamnose	-	-	+	-
Mannitol	_	+	+	+
Inositol	-	nd	nd	+
Sorbitol	-	+	+	-
Amygdaline	_	+	nd	+
Uréase	-	-	-	-
Nitrate Réductase	+	+	+	-
TDA (Tryptophane	+	nd	nd	-
DésAminase)				
Hydrolyse de l'amidon	+	+	+	-
Hydrolyse de CMC	+	nd	nd	nd
Hydrolyse de la pectine	+	+	nd	nd
Hydrolyse du xylane	-	nd	nd	nd
Hydrolyse de la caséine	+	+	+	v
Hydrolyse de la gélatiné	+	+	+	+
Hydrolyse de l'huile	-	nd	nd	nd
d'olive				
Hydrolyse de Tween 80	-	nd	-	nd
Hydrolyse de Tween 20	-	nd	nd	nd

Tableau 22. Caractéristiques biochimiques de la souche AC3 et de ses espèces les plus proches.

+: positive ; - : négative ; d: des souches différentes donnent des réactions différentes ; nd: non déterminé.

Caractéristiques	AC22	B. subtilis	B. mojavensis	B. halotolerans	<i>B</i> .	
		(Logan et De	(Logan et De	(Song et al.,	xiamenensis	
		Vos, 2015)	Vos, 2015)	2017)	(Lai et <i>al</i> .,	
					2013)	
Gram	+	+	+	+	+	
Oxidase	+	d	+	+	+	
Catalase	+	+	+	+	+	
ONPG	+	+	nd	+	+	
LDC	+	-	-	nd	nd	
ODC	-	-	-	-	nd	
ADH	-	-	-	-	-	
Utilisation du Citrate	-	+	+	-	nd	
Production d'H ₂ S	-		-	-	nd	
Production d'indole	-	-	-	-	-	
Voges Proskaur (VP)	-	+	+	+	nd	
Rouge de méthyle (RM)	-	+	+	+	-	
Glucose	+	-	+	-	nd	
Arabinose	-	d	-	-	nd	
Melibiose	+	+	+	+	nd	
Saccharose	-	-	+	-	+	
Rhamnose	+	+	+	-	+	
Mannitol	-			+	nd	
Inositol	-	+	+	-	+	
Sorbitol	+	+		+	nd	
Amygdaline	-	-	-	-	-	
Uréase	nd	+	+	+	-	
Nitrate Réductase	+	nd	nd	nd	nd	
TDA (Tryptophane	+	+	+	+	-	
DésAminase)						
Hydrolyse de l'amidon	+	nd	nd	nd	nd	
Hydrolyse de CMC	+	+	nd	nd	nd	
Hydrolyse de la pectine	-	nd	nd	nd	nd	
Hydrolyse du xylane	+	+	+	+	nd	
Hydrolyse de la caséine	+	+	+	-	+	
Hydrolyse de la gélatiné	+	nd	nd	nd	nd	
Hydrolyse de l'huile	-	nd	-	nd	nd	
d'olive						
Hydrolyse de Tween 80	-	nd	nd	nd	nd	
Hydrolyse de Tween 20						

Tableau 23. Caractéristiques biochimiques de la souche AC22 et de ses espèces les plus proches.

+: positive ; - : négative ; d: des souches différentes donnent des réactions différentes ; nd: non déterminé.

Isolat	Diamètre de la colonie	Diamètre de l'halo	Indice enzymatique
	(mm)	(mm)	
AC1	10	17	1.70
AC3	6	10	1.67
AC12	6	13	2.17
AC22	10	18	1.80
AC40	6	11	1.83
AC48	9	15	1.67



ملخص

إن إنزيمات الإماهة المفرزة خارج الخلية من طرف البكتيريا المحبة للملوحة خاصة منها المعزولة من الأغذية المالحة قد حظيت باهتمام كبير في السنوات الأخيرة. الهدف الرئيسي من هذه الأطروحة هو البحث عن مميزات و تطبيقات التكنولوجيا الحيوية للأميلاز المنتج خارج الخلية من طرف البكتيريا محبة الملوحة ومتحملة القلوية ، Bacillus flexus AC12، المعزولة من الأنشوجة المملحة تقليديا (Engraulis encrasicolus). استنادا على خصائص الجودة كانت العينات آمنة و مصنفة على أنها شبه ناضجة. هذه الدراسة تعتبر التقرير الأول من نوعه الذي يصف تأثير عمق نفس البرميل على خصائص جودة الأسماك. استخدام طريقة OVAT لتحسين عملية إنتاج الإنزيم أدى إلى زيادتها بمقدار 12.86 مرة. من حيث المتطلبات الغذائية، يعتبر النشا أفضل مصدر للكريون، ويفضل استخدام أشكال النيتروجين غير العضوي(Ca(NO3)2) منخفضة التكلفة. كشفت دراسة مميزات الإنزيم عن وجود أميلاز بوزن جزيئي 85 كيلو دالتون ذو خصائص مثيرة للاهتمام حيث كان مستقرا حراريا و درجة تحمله الإنزيم عن وجود أميلاز بوزن جزيئي 85 كيلو دالتون ذو خصائص مثيرة للاهتمام حيث كان مستقرا حراريا و درجة تحمله لوسط قلوي و تركيز ملحي عالي معتبرة. أظهرت تطبيقات الإنزيم في تصفية عصير التفاح وتركيب المنظفات نتائج واعدة. إنتاجه بطريقتي التخمير في وسط صلب و التخمير المغمور باستعمال نفايات المطبخ و النفايات الزراعية كأوساط منخفضة التكلفة أظهر فعالية طريقة الخمير في وسط صلب و التخمير المغمور باستعمال نفايات المطبخ و النفايات الزراعية كأوساط منخفضة التكلفة أظهر المورز خارج الخلية ، دراسة مميزات، الإنتاج.

Résumé

Les hydrolases extracellulaires produites par des bactéries halophiles isolées d'écosystèmes alimentaires salés ont reçu beaucoup d'attention ces dernières années. L'objectif principal de cette thèse est la caractérisation et la mise en évidence d'applications biotechnologiques d'une amylase extracellulaire produite par une bactérie halo-alcalitolérante, Bacillus flexus AC12, isolée d'anchois salés-mûrs traditionnels (Engraulis encrasicolus). En termes d'attributs de qualité, les échantillons étaient sans risque sanitaire et classés comme semi-mûrs. Il s'agit du premier rapport décrivant l'effet de profondeur du même tonneau sur les caractéristiques de qualité du poisson. L'utilisation de l'approche OVAT pour optimiser le processus de production enzymatique a permis de multiplier la production par 12.86. En termes d'exigences nutritionnelles, l'amidon est la meilleure source de carbone, et les formes d'azote inorganique à faible coût (Ca(NO₃)₂) sont préférées. La caractérisation de l'enzyme a révélé une amylase avec un poids moléculaire de 85 kDa et des stabilités thermiques, de pH et de concentration en sel intrigantes ; elle était thermostable, alcalitolérante et hautement stable au sel. Les applications de l'enzyme dans la clarification du jus de pomme et la formulation de détergents donnent des résultats prometteurs. Sa production sous fermentations en milieu solide et submergée en utilisant des déchets de cuisine et agricoles comme milieux à faible coût démontre l'efficacité de la méthode de fermentation en milieu solide avec les déchets de cuisine.

Mots-clés: Anchois salé-mûr, effet de profondeur, halo-alcalitolérant, *Bacillus flexus* AC12, amylase extracellulaire, caractérisation, production.

Abstract

Extracellular hydrolases produced by halophilic bacteria isolated from salty food ecosystems have received a lot of attention in recent years. The primary goal of this thesis is the characterization and highlighting of biotechnological applications of an extracellular amylase produced by a haloalkalitolerant bacterium, *Bacillus flexus* AC12, isolated from traditional salted-ripened anchovies (*Engraulis encrasicolus*). In terms of quality attributes, samples were safe and rated as semiripened. This is the first report describing the depth effect of the same barrel on fish quality characteristics. The OVAT approach use to optimize the enzymatic production process, resulting in a 12.86-fold increase. In terms of nutritional requirements, starch is the best carbon source, and low-cost inorganic nitrogen forms (Ca(NO₃)₂) are preferred. Enzyme characterization revealed an amylase with an 85 kDa molecular weight and intriguing thermal, pH, and salt concentration stabilities; it was thermostable, alkalitolerant, and highly salt stable. Enzyme applications in apple juice clarification and detergent formulations yield promising results. Its production in solid state and submerged fermentations using kitchen and agricultural wastes as low-cost media demonstrates the solid state fermentation method's efficiency with kitchen wastes.

Keywords: Salted-ripened anchovy, depth effect, halo-alkalitolerant, *Bacillus flexus* AC12, extracellular amylase, characterization, production.