

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



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologie

Réf :

Mémoire

Présenté par

BOULKROUNE Yasmine et DJERROUDI Bouchra Ghozlane

Pour l'obtention du diplôme de

Master Académique

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

**Optimisation de l'effet des ultrasons sur l'activité de
l'alpha amylase thermostable**

Soutenu le : 01.07.2024

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Mme ADJEROUD Nawel	MCA	Présidente
Mr BETTACHE Azzeddine	Pr	Encadrant
Mr NOURI Hamid	MCA	Examineur

Année Universitaire : 2023 - 2024

Dédicaces

*Avant tout propos, je tiens à rendre grâce à Allah qui m'a guidé sur la
bonne voie.*

Je dédie ce mémoire de fin de cycle

*À mon cher père, toujours présent et soutenant. Tes encouragements et ta
motivation m'ont permis de réaliser cette réussite.*

*À ma chère mère, dont le soutien et les encouragements m'ont accompagné
durant toutes ces années d'étude.*

Que Dieu vous garde en bonne santé et vous procure une longue vie.

*À ma chère sœur Lydia pour ses encouragements permanents et son soutien
moral.*

*À mon cher frère Amine qui m'a toujours encouragé et soutenu durant
toutes mes années universitaires.*

À ma meilleure amie Houda

À toute ma famille

*À ma Camarde BOUCHRA GHOZZANE, Avec qui j'ai eu la chance et
le plaisir de travailler afin d'achever Mon cycle de master.*

B. YASMINE

Dédicaces

*En ce jour où je termine ce chapitre de ma vie et avant de célébrer ma résilience,
ma persévérance et ma volonté de toujours avancer je rends grâce au bon*

DIEU

*Que ce mémoire soit non seulement un témoignage de mes efforts, mais aussi un
humble hommage à :*

*Mon père, mon pilier inébranlable, qui m'a enseigné la valeur de la
persévérance et de la foi*

*Ma mère, mon espoir, lumière éternelle de mon cœur et source intarissable
d'amour*

*Mon frère **BOUZID**, mon complice de toujours et mon alter ego*

*Mes confidentes et mes complices, mes merveilleuses sœurs **LYDIA**, **NIHED**
et **AMINA***

Mes grands-pères, mes anges silencieux qui toujours présents dans mon cœur

Mes grands-mères, mes piliers de soutien grâce à leurs prières affectueuses

Mes oncles, mes tantes, mes cousins et cousines et à toute ma famille

*Ma meilleure amie **Ahlam**, qui est toujours là pour moi avec son soutien et ses
encouragements constants*

*Ma camarade **YASMINE**, qui sa persévérance a illuminé notre chemin vers
l'accomplissement*

D.Bouchra Ghozlane

Remerciements

Au terme de notre travail, nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères et les plus profonds Au bon Dieu le tout puissant.

*On voudrait tout d'abord remercier notre promoteur **Mr. Azzeddine BETTACHE** pour la confiance qu'il nous a témoigné, son soutien précieux et ses conseils éclairés qui ont été des piliers essentiels tout au long de l'élaboration de ce mémoire. Son expertise et son engagement ont apporté une grande valeur ajoutée, et nous sommes profondément reconnaissantes d'avoir eu l'opportunité de bénéficier de son mentorat bienveillant.*

*Sans oublier notre gratitude envers **Mme Zahra AZZOUZ** pour son soutien, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils tout au long de ce parcours, sa perspective complémentaire, qui a enrichi chaque étape de ce travail.*

Nos remerciements les plus sincères s'adressent aux membres du jury :

*À Monsieur **Hamid NOURI** pour avoir examiné notre travail avec attention et expertise.*

*À Madame **Nawel Adjeroud** pour avoir assuré la présidence du jury,*

Nous remercions également tous les enseignants du département de Biotechnologie et nos camarades Master 2 de la spécialité Biotechnologie microbienne, promotion 2024.

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Sommaire

I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Généralités sur les enzymes.....	3
I.1.1. Définition	3
I.1.2. Classification des enzymes	3
I.2. α -amylase	4
I.2.1. La phylogénie d' α -amylase.....	4
I.2.2. Structure d' α -amylase.....	5
I.2.3. Mécanisme d'action	5
I.2.4. Différentes Sources	6
I.2.5. Caractéristiques de l' α -amylase	6
I.2.6. Applications industrielles de l' α -amylase	7
I.2. Généralités sur les ultrasons	9
I.2.1. Définition	9
I.2.2. Mécanisme d'action.....	10
I.2.3. Applications des ultrasons	11

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1. Effet des ultrasons sur l'activité de l'enzyme α -amylase thermostable	13
II.2. Dosage de l'activité de l' α -amylase.....	13

II .3. Dosage des protéines	13
II.4. Optimisation par la méthode OFAT (One Factor At time)	14
II .4.1. Influence de l'amplitude (puissance) des ultrasons sur l'activité de l' α -amylase	14
II.4.2. Effet du temps de traitement par ultrasons.....	14
II.4.3. Effet de la température d'incubation.....	14
II.4.4. Effet de la concentration en calcium.....	15
II.5. Analyse statistique	15
II.6. Optimisation de l'activité amylolytique avec le modèle de surface de réponse (RSM) en utilisant le plan Box-Behnken.....	15

III.RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Optimisation par OFAT	18
III.1.1. Effet de l'amplitude des ultrasons sur l'activité de l' α -amylase	18
III.1.2. Effet de la durée du traitement par ultrasons sur l'activité enzymatique de l' α -amylase thermostable	19
III.1. 3. Effet de la température	20
III.1.4. Effet de la concentration du calcium.....	22
III.2.Analyse statistique.....	23
III.3.Optimisation de l'activité amylolytique avec le plan Box-Behnken.....	24
III.3.1.Modèle mathématique	25
III.3.2.Analyse de la variance (ANOVA)	25
Analyse des interactions entre les facteurs.....	26
III.3.4.Validation du modèle :	32

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Liste des tableaux :

Tableau 1: Classification des enzymes, les principales catégories enzymatiques dans le système EC.....	3
Tableau 2: Nomenclature de l' α -amylase.....	4
Tableau 3: Utilisations de l' α -amylase dans l'industrie agroalimentaire.....	7
Tableau 4: Plan de Box-Behken avec trois variables indépendantes et les valeurs d'activité correspondantes.....	16
Tableau 5 : Matrice des expériences.....	17
Tableau 6: Analyse de la variance ANOVA.....	25
Tableau 7: Validation du modèle quadratique pour étude de l'effet des ultrasons à l'aide de la méthode de surface de réponse (RSM).	32

Liste des figures :

Figure 1: Structure tridimensionnelle de l' α -amylase	5
Figure 2: Gammes de fréquences du son	9
Figure 3: La croissance de l'implosion d'une bulle de cavitation.....	10
Figure 4: Effet de l'amplitude des ultrasons sur l'activité de l'enzyme α -amylase thermostable. .	18
Figure 5: Effet de la durée du traitement par ultrasons sur l'activité enzymatique de l' α -amylase thermostable	20
Figure 6: Effet de température des ultrasons sur l'activité α - amylase thermostable.	21
Figure 7: Influence de la concentration en calcium sur l'activité α -amylase avec et sans traitement par ultrasons.	23
Figure 8: Comparaison entre les valeurs prédites et les valeurs réelles (A), ainsi que leur répartition (B) basée sur la conception du plan Box-Behnken (BBD).....	24
Figure 9: Interaction entre les paramètres A (amplitude) et B (temps).....	27
Figure 10: Interaction entre les paramètres A (amplitude) et C (température).	28
Figure 11: Interaction entre les paramètres A (amplitude) et D (Concentration en calcium).	29
Figure 12: Interaction entre les paramètres B (temps) et C (température).	30
Figure 13: Interaction entre les paramètres B (temps) et C (concentration en calcium).	31
Figure 14: Interaction entre les paramètres D (concentration en calcium) et C (température).	32

Liste des abréviations :

BBD	Box-Behnken Design
BSA	Albumine de Sérum Bovin
DNS	Acide 3,5-dinitrosalicylique
EC	Enzyme Commission
Glu	Glucose
OFAT	One Factor At Time
RSM	Response Surface Methodology
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
ST	Sans Traitement
US	Ultrasons

Introduction

L'amidon est un polymère naturel essentiel, jouant un rôle crucial dans l'alimentation et la biotechnologie, où il est utilisé dans une variété d'applications allant de la nutrition humaine et animale à la fabrication de papier et de biocarburants. La dégradation de ses composants principaux, l'amylose et l'amylopectine, constitue une étape critique dans de nombreux processus industriels et de laboratoire. Cette dégradation est réalisée par des méthodes chimiques ou enzymatiques, ces dernières étant préférées pour leurs conditions d'hydrolyse plus douces (**Robyt, 2008**).

L'hydrolyse enzymatique de l'amidon, qui transforme l'amidon en glucose, se déroule en deux phases : la liquéfaction, catalysée par l' α -amylase, suivie de la saccharification, catalysée par la glucoamylase (**Olsen, 1995**). L' α -amylase joue un rôle central en catalysant l'hydrolyse aléatoire des liaisons osidiques dans l'amylose, l'amylopectine, l'amidon, le glycogène et d'autres polysaccharides contenant des liaisons $\alpha(1,4)$ D-glucose (**Bennamoun & al., 2004**).

Les applications de l' α -amylase sont variées et incluent la conversion de l'amidon en glucose dans l'industrie glucoserie, la production de sirops de glucose et autres édulcorants dans l'industrie sucrerie, la dégradation de l'amidon des grains pour produire des sucres fermentescibles dans la brasserie, l'élimination de l'amidon des tissus dans l'industrie textile et l'amélioration de l'efficacité des lessives par dégradation de l'amidon présent dans les taches alimentaires dans l'industrie des détergents.

Dans l'industrie alimentaire, l'inactivation de l' α -amylase est souvent une étape finale pour éliminer ou stopper son effet dans les produits alimentaires finis. Par exemple, dans la production de yaourt, il est crucial d'inactiver l' α -amylase pour éviter la dégradation continue de l'amidon, ce qui pourrait altérer la texture et le goût du produit final.

L'innovation de nouvelles approches pour optimiser l'activité de l' α -amylase est d'une importance considérable. Parmi ces innovations, l'utilisation des ultrasons a suscité un intérêt croissant au cours de la dernière décennie (**Nadar & Rathod, 2017**). Les ultrasons représentent une technologie prometteuse avec des applications variées dans l'alimentation et la biotechnologie. Dans l'industrie alimentaire, les ultrasons peuvent améliorer la qualité des

produits de boulangerie en modifiant la structure du gluten (**Martini & al., 2020**). Ils peuvent également être utilisés pour l'homogénéisation du lait et la réduction de la taille des gouttelettes de matière grasse (**Chandrapala & al., 2013**). Dans le domaine de la biotechnologie, les ultrasons peuvent accélérer la fermentation alcoolique en améliorant la perméabilité des membranes cellulaires des levures (**Chisti & Moo-Young, 1986**). Ils peuvent activer et inactiver les enzymes sans altérer significativement les propriétés des aliments traités, bien qu'une exposition prolongée puisse entraîner la dénaturation des enzymes en raison de la chaleur générée par la haute puissance des ultrasons (**Leangnim & al., 2023**).

Les méthodes classiques d'optimisation, qui modifient une seule variable à la fois en maintenant les autres constantes, sont souvent insuffisantes pour déterminer des conditions optimales car elles ignorent les interactions entre les facteurs. En revanche, le Modèle de surface de réponse (RSM) est un outil puissant pour identifier les conditions optimales en prenant en compte les interactions complexes entre les variables indépendantes (**Montgomery & al., 2017**). Les ultrasons peuvent inactiver les enzymes en modifiant peu les propriétés de l'aliment traité. Cependant, une exposition prolongée peut également entraîner la dénaturation des enzymes. De plus, la haute puissance des ultrasons peut générer de la chaleur, ce qui contribue à cette dénaturation (**Earnshaw & al., 1995; Kadkhodae & Povey, 2008; Leangnim & al., 2023**).

L'objectif principal de ce travail est :

- Etude de l'effet des ultrasons sur l'activité de l' α amylase thermostable.
- Optimisation de l' α -amylase par RSM.

Le manuscrit est scindé en trois grandes parties :

- Première partie : relate une synthèse bibliographique sur les ultrasons, leur mode d'action et leurs diverses applications. Cette partie est complétée par des informations détaillées sur l'enzyme α -amylase thermostable.
- Deuxième partie : rapporte les outils et les approches méthodologiques employés.
- Troisième partie : expose les résultats obtenus suivis d'une interprétation et discussion approfondie.

Enfin, nous concluons en résumant nos observations et en explorant les perspectives futures de cette étude.

Synthèse
Bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur les enzymes

I.1.1. Définition

Tous les organismes vivants, des bactéries aux êtres humains, dépendent de catalyseurs biologiques appelés enzymes pour leur survie. Les enzymes sont des protéines fonctionnelles de masse moléculaire élevée, variant d'environ 10 à 1 000 kDa (**Burhan & al., 2002**) qui accélèrent les réactions chimiques dans les organismes vivants (**Berg & al., 2002**). Elles agissent comme des catalyseurs, permettant aux réactions de se produire plus rapidement et plus efficacement sans être consommées ou modifiées au cours du processus. Les enzymes sont très spécifiques, ce qui signifie qu'elles ne catalysent qu'une seule réaction spécifique ou un petit groupe de réactions apparentées (**Alberts & al., 2002**). Cette spécificité est due à leur structure tridimensionnelle unique, qui leur permet de se lier à des substrats spécifiques et de faciliter la conversion de ces substrats en produits.

I.1.2. Classification des enzymes

La commission internationale des enzymes a classé les enzymes en six catégories distinctes: les oxydoréductases, les transférases, les hydrolases, les lyases, les isomérases et les ligases, selon la classification EC (**Farooq & al., 2021**).

Tableau 1: Classification des enzymes, les principales catégories enzymatiques dans le système EC (**Robinson., 2015**).

Premier chiffre	Classe d'enzyme	Type de réaction
1	Oxydoréductases	Oxydation/réduction
2	Transférases	Transfert des radicaux chimiques
3	Hydrolases	Hydrolyse
4	Lyases	Élimination de groupement et formation de doubles liaisons
5	Isomérases	Isomérisation
6	Ligases	Formation de liaisons couplées à l'hydrolyse de l'ATP

I.2. α -amylase

Les amylases, constituant l'un des groupes d'enzymes industrielles les plus essentiels à l'échelle mondiale, représentent environ un quart du marché des enzymes (Leaes & al., 2013). Ces enzymes hydrolases prédominantes, hydrolysent les liaisons glycosidiques dans les molécules d'amidon, produisant des dextrines et des oligosaccharides, elles appartiennent à la famille des glycosides hydrolases.

Les amylases, agissent spécifiquement sur les liaisons α -1,4-glycosidiques dans l'amidon, il existe deux principaux types d'amylases :

- **Exo-amylases**, qui dégradent l'extrémité non réductrice de l'amidon, produisant des oligosaccharides linéaires et ramifiés de différentes longueurs de chaîne (Farooq & al., 2021).
- **Endo-amylases**, qui hydrolysent les liaisons glycosidiques à l'intérieur de la molécule d'amidon, ce qui entraîne successivement des produits finaux courts (Farooq & al., 2021).

Tableau 2: Nomenclature de l' α -amylase (Mercier, 1985)

Nom codifié	E.C .3.2.1.1
Nom recommandé	Alpha-amylase
Nom systématique	α (1 \rightarrow 4) D-glucane glucano-hydrolase
D'autres nom (s)	Glycogénase, endoamylase, maxilase, taka-amylase A, takatherm, thermolase, amylotherm, clarase, amylopsin, spitase CP1, G995, kleistase L1, THC 250, maxamy, ptyalin.

I.2.1. La phylogénie d' α -amylase

L' α -amylase, une enzyme présente chez une variété d'organismes allant des bactéries aux mammifères, a fait l'objet de nombreuses études évolutives approfondies. Phylogénétiquement, les gènes d'alpha-amylase des plantes se divisent en deux classes principales : AmyA et AmyB, avec des sous-familles telles que Amy1 et Amy2 au sein d'AmyA (Huang & al., 1992). Les domaines structuraux essentiels de l' α -amylase comprennent le domaine catalytique en tonneau (β/α)₈, caractéristique des glycosidases, ainsi que des domaines C-terminaux impliqués dans la liaison au calcium et au chlore (Janecek., 1997). L'analyse comparative des séquences et des structures 3D a permis de mieux comprendre les relations évolutives entre les α -amylases de différentes origines (Janecek., 1994). Les similitudes de structure sont plus étroitement liées à la

phylogénie que les similitudes de séquence, reflétant l'importance des aspects fonctionnels dans l'évolution de cette enzyme ubiquitaire (**Janecek., 2015**).

I.2.2. Structure d' α -amylase

L' α -Amylase est composée de trois domaines distincts nommés A, B et C.

Le domaine **A**, le plus étendu.

Le domaine **B**, situé entre les domaines C et A,

Des liaisons disulfure relient le domaine A au domaine C, tandis que la fonction du domaine **C** inconnu (**Farooq & al., 2021**).

Calcium (Ca^{2+}) : situé entre le domaine A et domaine B, possède un rôle important pour conserver la stabilité de l'enzyme par quatre acides aminés (Histidine, Glutamate, Aspartate, Asparagine).

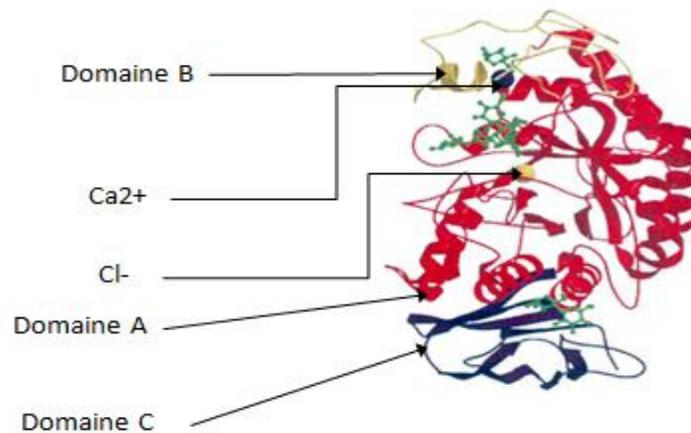


Figure 1: Structure tridimensionnelle de l' α -amylase (**Souza & al., 2010**)

I.2.3. Mécanisme d'action

Le fonctionnement de l' α -amylase repose sur un mécanisme d'action impliquant trois fonctions du site actif : un nucléophile un stabilisateur de la charge positive de l'atome attaqué, et un donneur de proton au groupe déplacé.

Cette dynamique implique une série d'échanges d'électrons et de protons entre certains résidus de l'enzyme et du substrat lors de la rupture de la liaison osidique. Ces interactions sont caractéristiques de l'enzyme et varient selon les conditions expérimentales telles que la température, le pH, la taille et la structure du substrat (**Parkc & al., 1997**).

I.2.4. Différentes Sources

Les α -amylases thermostables, proviennent de diverses sources telles que les plantes, les animaux et les microorganismes.

- **Source Animale**

L' α -amylase d'origine animale est généralement obtenue à partir de la salive humaine ou du pancréas de mammifères tels que les porcs et les veaux (Chatterton & al., 1996).

- **Source Végétale**

L'enzyme végétale est habituellement extraite des céréales telles que le blé, l'orge, le son ou le riz, souvent produite lors de la germination des graines (Rao & al., 2005).

- **Source Microbienne**

Les α -amylases microbiennes synthétisées sont obtenues à partir de champignons et de bactéries et sont largement utilisées dans diverses recherches scientifiques et secteurs industriels (Farooq & al., 2021), deux types d' α -amylase sont énumérés: α -amylase fongique et α -amylase bactériennes.

I.2.5. Caractéristiques de l' α -amylase

- **Le poids moléculaire**

La plupart des α -amylases ont un poids moléculaire compris généralement entre 40 000 et 70 000 Da, mais il peut varier selon leur origine et leur espèce (El-Fallal & al., 2012).

- **La température optimale d'activité**

La température optimale d'activité des enzymes varie selon l'espèce et leur origine, Généralement les α -amylases ont une température optimale d'activité, comprise entre 40 et 70 °C. Les α -amylases bactériennes ont une plus grande stabilité thermique par rapport aux amylases fongiques. La température optimale des α -amylases bactériennes varie entre 50 à 95 °C alors que celle des α -amylases fongiques varie entre 40 à 60 °C. L' α -amylase levurière a des températures maximales, allant de 40 à 60 °C et parfois même 70 °C (Schomburg & Salzmann., 1991).

- **Le pH optimal d'activité**

Les α -amylases ont une stabilité générale entre pH 4 et 8. L'optimum de pH varie selon leur origine, il est souvent entre 4 et 5 pour les α -amylases fongiques, entre 6 et 8.5 pour les bactériennes, et entre 4 et 6 pour les levures (Schomburg & Salzmann., 1991).

▪ Effet des ions métalliques sur l'activité de l' α -amylase

L' α -amylase est une métallo-enzyme qui dépend du Ca^{2+} et celui-ci joue le rôle d'un activateur allostérique, tout en assurant la fonction de stabilisateur en préservant la structure tertiaire de l'enzyme contre la dénaturation thermique (Savchenko & al., 2002), Les ions Cl^- , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} sont également des activateurs de l' α -amylase (Saini & al., 2017).

I.2.6.Applications industrielles de l' α - amylase

Agro-alimentaires

En biotechnologie, l' α amylase possède de nombreuses applications industrielles (tableau 03).

Tableau 3: Utilisations de l' α -amylase dans l'industrie agroalimentaire (Mobini & Javan, 2012).

Industries	Applications
Glucoserie	La dégradation et la transformation de l'amidon s'accompagnent d'une baisse significative de la viscosité.
Brasserie	- Clarification ; - Compléments des enzymes de malt.
Sucrerie	Faciliter les processus d'extraction et de raffinage du saccharose à partir de la betterave ou de la canne à sucre en éliminant les traces d'amidon qui nuisent à la purification.
Textile	-Le désencollage des tissus. -L'amélioration de la résistance du textile.
Détergent	L'ajout de cet enzyme aux détergents les rend plus efficaces pour enlever les taches difficiles. Il augmente aussi leur pouvoir blanchissant

Médical et pharmaceutique

Les α -amylases sont utilisées dans le domaine pharmaceutique comme agents anti-inflammatoires et pour traiter les troubles digestifs, tels que les indigestions et les fermentations intestinales (Mobini-Dehkordi & Javan, 2012).

Dans le domaine médical, un taux élevé d' α -amylases peut indiquer des problèmes de santé comme une inflammation aiguë du pancréas, une macroamylasémie et les oreillons. L' α -amylase peut aussi être mesurée dans l'urine et le liquide péritonéal (**Saranraj & Stella, 2013; Singh & al.,2011**).

I.2. Généralités sur les ultrasons

I.2.1. Définition

Les ultrasons sont formés par des ondes sonores mécaniques générées par des mouvements moléculaires vibrant à travers un milieu de transmission, Leur fréquence est extrêmement élevée, atteignant environ 20 kHz (**Gallo & al., 2018**).

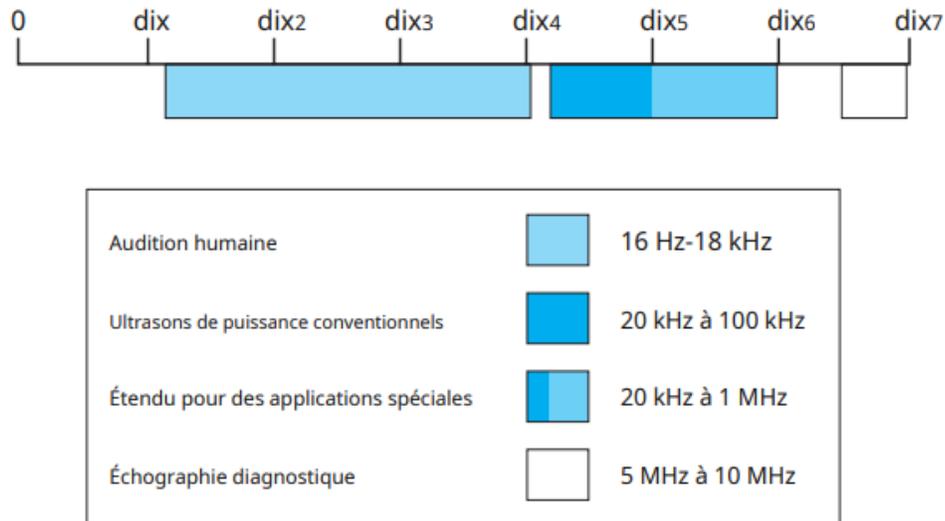


Figure 2: Gammes de fréquences du son (**Sun, 2005**)

On peut diviser ces ultrasons en deux principaux types:

- Ultrasons de puissance : Aussi connus sous le nom d'ultrasons à basse fréquence, ils sont caractérisés par des fréquences plus basses, typiquement entre 20 kHz et 100 kHz, et sont capables de générer des effets physiques importants comme la cavitation acoustique.
- Ultrasons à haute fréquence : Ces ultrasons, aussi appelés ultrasons de fréquence élevée, sont utilisés principalement pour des applications de diagnostic et de nettoyage en raison de leurs fréquences plus élevées, typiquement supérieures à 1 MHz. (**Yu & al., 2014**) .

Les ultrasons puissants sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire pour la transformation, la conservation, l'extraction et d'autres applications en raison de leurs propriétés, et respectueuses de l'environnement (**Yu & al., 2014**).

I.2.2. Mécanisme d'action

Les ultrasons sont des ondes sonores à haute fréquence, largement utilisés dans divers domaines, leur mécanisme d'action repose sur la cavitation, un processus où des bulles de gaz se forment et implosent sous l'effet de la pression des ondes ultrasonores. Cette implosion crée des forces mécaniques et des ondes de choc qui peuvent altérer les tissus biologiques environnants (**Leong & al., 2013**).

En plus de la cavitation, les ultrasons peuvent également générer des effets thermiques lorsqu'ils sont absorbés par les tissus biologiques, provoquant une augmentation locale de la température. Cela peut entraîner des modifications biochimiques et des effets biologiques, tels que la coagulation des protéines ou des changements dans la perméabilité cellulaire.

Ainsi, les ultrasons agissent principalement par cavitation, avec des effets mécaniques et thermiques sur les tissus biologiques (**Leong & al., 2013**).

Les enchaînements de cycles de pressions et de décompressions induisent une force acoustique. Cette force est positive lors des cycles de pression et négative pendant les cycles de décompression. Ces changements de force entraînent des mouvements moléculaires, provoquant des expansions et des rapprochements entre les différentes molécules (**Chemat & al., 2011**).

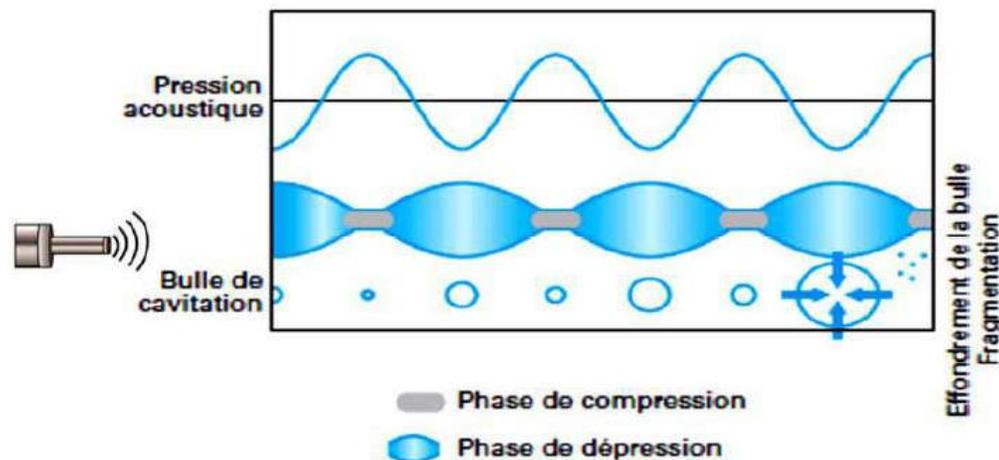


Figure 3: La croissance de l'implosion d'une bulle de cavitation (**Behling & al., 2016**)

- Effet sur les tissus biologique

Les ultrasons appliqués aux solutions aqueuses provoquent des réactions chimiques dues à la cavitation acoustique, qui implique la formation, la croissance et l'effondrement de petites bulles de gaz dans les liquides.

Lorsque ces bulles implosent, elles génèrent des températures et des pressions très élevées, entraînant la dissociation thermique de la vapeur d'eau en radicaux OH et atomes H. Les connaissances sonochimiques offrent une anticipation des effets potentiels des ultrasons, incluant: les altérations membranaires, les modifications de l'ADN, l'apoptose et les réponses génétiques, découlant de leurs interactions mécaniques (**Kondo, 2015**).

Les ultrasons peuvent induire des modifications structurales dans les protéines en perturbant leurs interactions non covalentes, comme observé dans diverses études. Ces effets peuvent influencer la stabilité et l'activité biologique des protéines, offrant ainsi des perspectives intéressantes pour la biotechnologie et la recherche pharmaceutique (**Choi et al., 2017**).

I.2.3. Applications des ultrasons

➤ Dans le domaine alimentaire

Les ultrasons sont devenus un pilier de la technologie alimentaire, dynamisant le progrès dans la transformation, la conservation et l'extraction des aliments. Contrairement aux méthodes traditionnelles, l'utilisation d'échographie repose sur des principes physiques et chimiques distincts, ouvrant de nouvelles voies pour l'innovation dans ce domaine crucial (**Chemat & al., 2011**). Par exemple, ils permettent une extraction améliorée de composés bioactifs (**Toma & al., 2013**), la réduction de la viscosité et l'amélioration des propriétés texturales (**Ashokkumar & al., 2009**). Exemples d'applications : Extraction améliorée de composés bioactifs (**Toma et al., 2013**). Réduction de la viscosité et amélioration des propriétés texturales (**Ashokkumar & al., 2009**).

➤ En industrie pharmaceutique

Les ultrasons ont été identifiés comme ayant un potentiel industriel prometteur dans le domaine de l'extraction phytopharmaceutique, couvrant une variété étendue d'extraits de plantes (**Vilkhu & al., 2008**).

➤ **En médecine**

Les signaux renvoyés sont utilisés pour créer une image numérique de la partie du corps examinée, Ils sont principalement employé pour les examens d'imagerie médicale et se révèle efficace pour visualiser les tissus mous du corps. Les parties superficielles comme les muscles, les tendons, les testicules, les seins, ainsi que les glandes thyroïde et parathyroïde, ainsi que le cerveau néonatal, sont scannées à une fréquence plus élevée afin d'améliorer la résolution axiale et latérale(**Kondo, 2015**).

➤ **L'extraction de substance d'origine animale**

Des recherches ont été menées sur l'utilisation des ultrasons pour l'extraction de composés à partir de matières animales. Exemple : extraction de la chitine des coquilles de crevettes d'eau douce (**Kjartansson & al., 2006**) et la lutéine du jaune d'œuf (**Xiaohua & al., 2006**) en utilisant la sonication (**Vilkhu & al., 2008**).

➤ **En biotechnologie**

L'effet des ultrasons est en rapport avec les conditions de traitement et d'autres paramètres, tels que le type d'enzyme impliqué (**McClements, 1995**), Pour garantir la stabilité de certains produits alimentaires, il est essentiel d'inactiver l'enzyme participant au processus de fabrication ou de minimiser son activité (**Mason & al., 1996**).

Les ultrasons sont devenus des outils essentiels dans diverses applications enzymatiques, améliorant la catalyse enzymatique, la synthèse chimique et la modification des propriétés des enzymes (**Brown & al., 2016**). Leur utilisation accrue non seulement augmente l'efficacité des réactions enzymatiques, mais permet également un contrôle précis des conditions de réaction, ouvrant la voie à des avancées innovantes en biotechnologie (**Brown & al., 2016**).

***Matériel
et
Méthodes***

II.1. Effet des ultrasons sur l'activité de l'enzyme α -amylase thermostable

Cette étude examine les effets de différents paramètres des ultrasons sur l'activité de l' α -amylase (Laboratoire de microbiologie Appliqué), tels que l'amplitude, temps de traitement, température d'incubation de l'enzyme en absence de substrat et la concentration d'ion du calcium.

II.2. Dosage de l'activité de l' α -amylase

Pour déterminer l'activité de l' α -amylase, le protocole de **Beilly, (1992)** est utilisé pour mesurer les sucres réducteurs avec quelques modifications.

Un mélange de solution contenant 900 ml de solution d'amidon à 2% est préparé dans un tampon phosphate 50mM (pH 7) et de 0,1 ml de solution enzymatique, ce dernier a été incubé à une température de 80 °C dans un bain marie (Cole-Parmer, USA) pendant 10 minutes, puis 1,5 ml de réactif acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) est ajouté. Le mélange est ensuite incubé à 100 °C pendant 5 minutes, suivie d'un refroidissement pendant 5 minutes dans l'eau glacée.

Une centrifugation à 13000 tr/mn pendant 1 minute a été effectuée afin d'éliminer les particules de polysaccharides d'amidon.

La lecture de l'absorbance est effectuée dans un spectrophotomètre UV-Visible (T60 PG instruments, Royaume Uni) à 540 nm. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose contenue dans les extraits, cette concentration est déterminée par référence à une courbe d'étalonnage (Annexe I, Figure 1).

II .3. Dosage des protéines

La quantité de protéines a été déterminée en utilisant la méthode de Bradford (1976), avec l'albumine de sérum bovin (BSA) comme protéine de référence.

Le protocole de dosage est comme suit :

- 800 μ l de l'extrait enzymatique ont été mélangés avec 200 μ l du réactif Bradford.
- Le mélange est agité, ensuite incubé à l'obscurité (température ambiante) pendant 5 à 10 minutes, suivi d'une lecture d'absorbance à 595 nm.

La quantité des protéines dans les extraits enzymatiques est déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage de protéine (Annexe II, Figure 02), construite à partir de différentes concentrations de BSA exprimée en mg/ml.

II.4. Optimisation par la méthode OFAT (One Factor At time)

L'optimisation a été portée sur les paramètres suivants: l'amplitude, le temps de traitement, la température d'incubation et la concentration du calcium.

Une approche expérimentale bien établie a été adoptée : l'OFAT (One Factor At Time), est impliqué dans le but de modifier chaque paramètre individuellement lors des expériences tout en gardant constants tous les autres facteurs.

II .4.1. Influence de l'amplitude (puissance) des ultrasons sur l'activité de l' α -amylase

Une étude a été menée pour évaluer l'effet de la puissance des ultrasons sur l'activité enzymatique de l' α amylase, une solution enzymatique ayant une concentration de 26 mg/ml a été préparée dans un tampon phosphate (pH = 7, 50mM) (Gaquere-Parkeretal., 2018).

150 ml d'une solution enzymatique a été utilisé pour étudier l'effet de chaque valeur d'amplitude, allant de 20 à 100 % avec un intervalle de 10, le temps de pulsation est réglé à 5 secondes de marche, 2 secondes d'arrêt, pendant 4 minutes.

Après traitement par ultrason (Vibra Cell VCX, USA) l'activité enzymatique de l'enzyme α -amylase est mesurée par la méthode de dosage des sucres réducteurs à l'aide de DNS.

II.4.2. Effet du temps de traitement par ultrasons

L'effet de temps de traitement sur l'activité de l'enzyme α -amylase est testé avec différent temps pour déterminer l'influence de ce facteur sur la stabilité de l'enzyme, selon les conditions suivantes :

-150 ml de solution enzymatique (26 mg/ml), a été utilisée en absence de substrat.

- L'amplitude a été fixée à 80 % avec des pulsations réglées à 5 secondes de marche et 2 secondes d'arrêt.

-l'enzyme est traitée avec des ondes d'ultrasons à des intervalles réguliers de 0 , 2 , 4 , 6 , 8 , 10 , 12 , 14 , 16 , 18 , 20 , 22 , 24 , 30 minutes, puis l'activité amylolytique a été mesurée avec des échantillons prélevés dans différents temps de traitements.

II.4.3. Effet de la température d'incubation

Dans les expériences menées, l'effet de différentes températures d'incubation sur l'activité de l'enzyme α amylase en absence de substrat a été étudié, 150ml de solution enzymatique a été incubée à différentes température : 65 °C, 70°C, 80 °C 90°C et 95°C pendant 5 min.

Après incubation, la solution a été traitée aux ultrasons, avec une amplitude fixé à 80 % et des pulsations de 5 secondes en marche suivies de 2 secondes d'arrêt pendant 4 minutes.

II.4.4. Effet de la concentration en calcium

Pour étudier l'influence de différences concentration d'ions métalliques, notamment de calcium, différentes concentrations ont été testées et ajoutées à 150 ml de solution enzymatique : (0,5 , 1 , 2 , 4 , 6 , 8 , 10 mM) avant traitement par ultrasons à 80 % d'amplitude , et des pulsations de 5 secondes en marche suivies 2 secondes d'arrêt pendant 4 minutes .

II.5. Analyse statistique

Toutes les expériences ont été réalisées avec trois répétitions.

Une analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée pour comparer les effets des ultrasons sur l'activité d' α -amylase avec un niveau de signification de $p < 0,05$.

Les valeurs de probabilité inférieures à 0,05 ($P < 0,05$) ont été considérées comme statistiquement significatives.

II.6. Optimisation de l'activité amylolytique avec le modèle de surface de réponse (RSM) en utilisant le plan Box-Behnken

La méthode de surface de réponse (RSM), en utilisant la matrice Box-Behnken (BBD) a été efficacement utilisé pour prédire les niveaux optimaux des variables dans l'espace expérimental permettant également d'analyser les interactions entre les facteurs .

Quatre facteurs ont été étudiés (tableau 04) à savoir, **A** : Amplitude, **B** : le Temps de traitements, **C** : la Température d'incubation, et **D** : la concentration du Calcium. Ces facteurs ont été étudiés à trois niveaux différents : valeur minimale (-1) et la valeur maximale (+1) et (0) pour la valeur moyenne.

Un total de vingt sept ($N = 27$) expériences ont été menées suivant au plan expérimental détaillé dans le tableau 05, et l'activité de l' α -amylase a été mesurée comme réponse, un modèle polynomial a été utilisé pour décrire la relation entre les facteurs et l'activité de l' α -amylase, comme exprimé dans l'équation (1).

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \dots\dots\dots(1)$$

N : Nombre d'essais, **K** : Nombre de facteur et **C₀** : Nombre de points centraux

Tableau 4: Plan de Box-Behken avec trois variables indépendantes et les valeurs d'activité correspondantes

Factor	Name	Units	Type	SubType	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean
A	Amplitude	%	Numeric	Continuous	40,00	80,00	-1↔40,00	+1↔80,00	60,00
B	Time	Min	Numeric	Continuous	1,0000	15,00	-1 ↔ 1,00	+1 ↔ 15,00	8,00
C	Temperature	°C	Numeric	Continuous	75,00	95,00	-1 ↔ 75,00	+1 ↔ 95,00	85,00
D	[Calcium]	ppm	Numeric	Continuous	0,0000	200,00	-1 ↔ 0,00	+1 ↔ 200,00	100,0

Les données expérimentales ont été soumises à une analyse de régression à l'aide du logiciel Design Expert 10® (Version10.0.5.0.USA).

L'équation du modèle polynomial du second ordre est présentée comme équation (2).

$$\hat{y} = b_0 + \sum_{j=1}^k b_j X_j + \sum_{\substack{u, j=1 \\ u \neq j}}^k b_{uj} X_u X_j + \sum_{j=1}^k b_{jj} X_j^2 + \varepsilon_i \dots\dots\dots 2$$

Dans cette équation, X_j exprimés en termes de variables étudié, où j varie de 1 à k .

b_0 : Terme constant de l'équation de régression ; b_j : Effets linéaires ; b_{uj} : Effets d'interactions ; $b_{j,j}$: Effets quadratiques .

Tableau 5 : Matrice des expériences

Run	Factor 1 A:Amplitude %	Factor 2 B:Time Min	Factor 3 C:Temperature °C	Factor 4 D:[Calcium] ppm	Response 1 Residuelactivity %
1	60	15	80	0	30,2112
2	40	8	95	100	50,5633
3	40	8	80	200	76,6233
4	60	8	95	200	72,3569
5	60	1	80	0	31,2201
6	60	8	80	100	30,8742
7	80	15	80	100	47,104
8	60	8	80	100	43,7889
9	60	15	80	200	64,2564
10	60	8	80	100	50,8516
11	80	8	65	100	71,0597
12	80	8	80	0	30,6724
13	60	1	80	200	82,36
14	80	8	80	200	84,0608
15	60	15	95	100	56,3865
16	80	1	80	100	38,6905
17	60	8	95	0	26,0024
18	60	1	95	100	40,1278
19	60	8	65	200	92,0172
20	40	1	80	100	35,0253
21	60	8	65	0	25,5952
22	60	15	65	100	72,8181
23	60	1	65	100	94,4387
24	80	8	95	100	52,8407
25	40	8	65	100	74,0289
26	40	15	80	100	46,5275
27	40	8	80	0	30,2112

***Résultats
et
Discussion***

III.1. Optimisation par OFAT

L'impact des ondes ultrasonores sur les enzymes est complexe, pouvant entraîner leur activation ou leur inactivation selon diverses conditions et l'intensité du traitement adaptée (McClements, 1995).

Cette étude se base sur la méthode OFAT pour ajuster de manière individuelle chaque paramètre. Et se concentrer spécifiquement sur l'effet des ultrasons sur l'activité de l' α -amylase, en raison de son implication dans la dégradation des liaisons α -1,4 gluosidiques de l'amidon.

III.1.1. Effet de l'amplitude des ultrasons sur l'activité de l' α -amylase

Afin d'étudier l'impact de l'intensité ultrasonore, la solution enzymatique en absence du substrat a subi un traitement aux ultrasons dans quel différentes puissances sont testées, allant de 20 à 100 % avec un intervalle de 10, pendant 4 minutes.

Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure n° 05, l'activité de l' α -amylase montre des augmentations, avec des taux d'activation de 138 % et 135 % observés à des amplitudes de 60 % et 80 % respectivement, atteignant ainsi des niveaux d'activité maximale par rapport au contrôle (ST). En revanche, une diminution de ces activités a été observée à des amplitudes de 20 %, 30 % et 40 %, avec des activités respectives de 91 %, 63 % et 53 %.

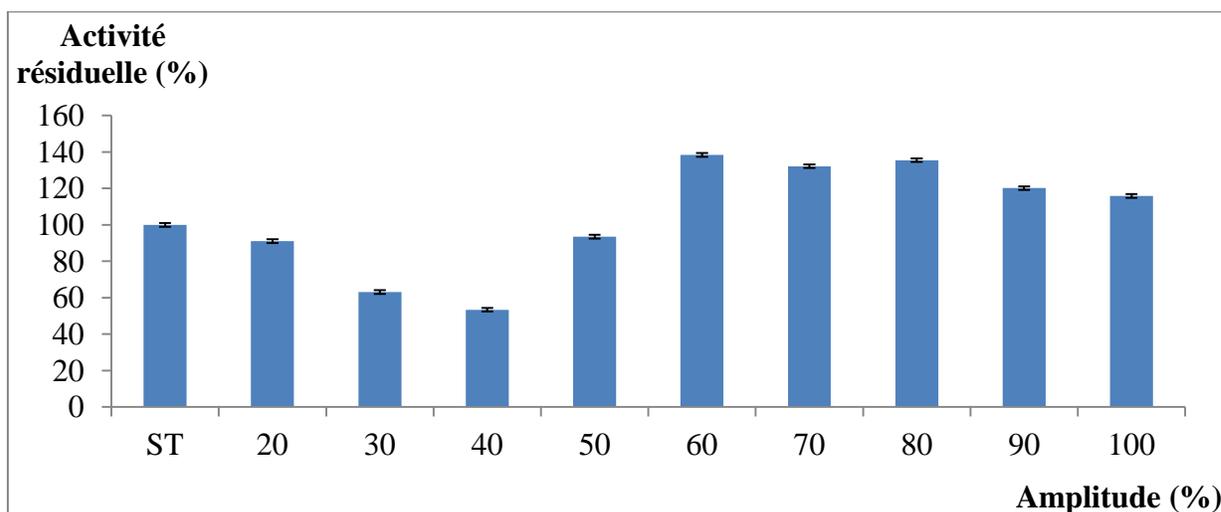


Figure 4: Effet de l'amplitude des ultrasons sur l'activité de l'enzyme α -amylase thermostable.

Dans des conditions de faible intensité et de fréquence appropriée, les ultrasons induisent des phénomènes de cavitation, d'effet magnétostrictif et d'oscillation mécanique

. Ces processus altèrent la conformation des enzymes, facilitant ainsi l'interaction entre l'enzyme et le substrat, ce qui augmente l'activité biologique des enzymes (**Jin & al., 2015**). Les ultrasons désactivent les enzymes principalement en induisant la dénaturation des protéines, processus qui se produit de deux manières distinctes. D'une part, les forces de cisaillement générées par la formation et la dispersion des bulles de cavitation contribuent à cette dénaturation. D'autre part, la génération de radicaux libres par la sonolyse des molécules d'eau joue un rôle crucial dans l'inactivation des enzymes (**Islam & al., 2014**).

Les effets physiques de la dénaturation des protéines incluent les forces excessives, les températures élevées et les ondes de choc localisées, tandis que les effets sonochimiques sont associés à la présence de radicaux libres à l'interface entre les bulles de cavitation et le liquide environnant (**Oliveira & al., 2017**).

III.1.2. Effet de la durée du traitement par ultrasons sur l'activité enzymatique de l' α -amylase thermostable

Une solution enzymatique en l'absence du substrat a été traitée par des ultrasons avec une amplitude de 80 % sur une gamme de temps allant de 2 à 30 minutes, avec des intervalles réguliers de 2 minutes. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure n° 06.

La figure 06 montre une diminution de l'activité enzymatique par rapport au ST à un temps de 2 ,4 et 6 minutes, ou elle atteint 62,7, 62 et 53% respectivement, et une augmentation de l'activité à un temps de 8 minutes qui est évaluée à 119%. Cela indique que l'optimum de ce paramètre est atteint à 8 minutes.

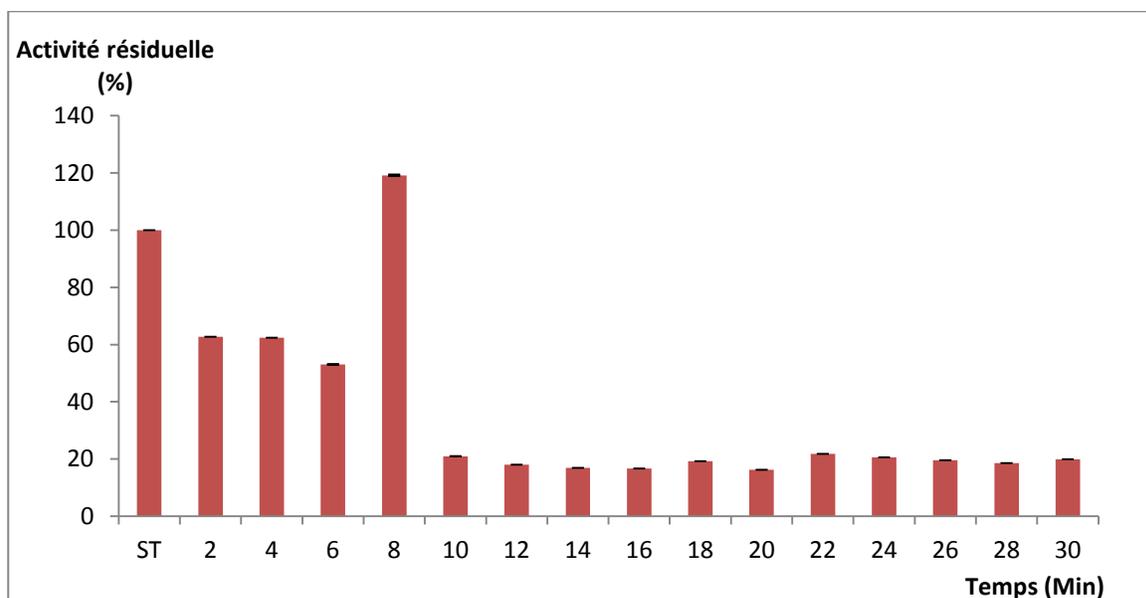


Figure 5: Effet de la durée du traitement par ultrasons sur l'activité enzymatique de l' α -amylase thermostable

Les ultrasons peuvent modifier la réponse moléculaire de l'enzyme, entraînant soit une augmentation, soit une diminution de son activité, l'activité diminue avec le temps de sonication, entraînant une inactivation croissante, la perte de solubilité de l' α -amylase dans un milieu salin tamponné au phosphate en raison des ultrasons pourrait entraîner des modifications de sa structure secondaire et tertiaire, et une augmentation de l'hydrophobicité et de l'agrégation de ses molécules (Rojas, Trevilín & Augusto, 2016 ; Islam & *al.*, 2014 ; Kadkhodae & Povey, 2008) .

L'inactivation de l'amylase par sonication peut être expliquée par des contraintes mécaniques ou des forces de cisaillement engendrées par les micro-flux et les ondes de choc, ces phénomènes peuvent modifier la structure secondaire et tertiaire de la protéine enzymatique en rompant diverses liaisons et en augmentant son hydrophobicité, ce qui entraîne le déplissement et l'exposition de résidus d'acides aminés hydrophobes (Özbek & Ülgen, 2000).

III.1. 3. Effet de la température

L'effet de la température sur l'activité de l' α -amylase thermostable a été étudié en absence du substrat à six températures différentes : 65°C, 70°C, 80°C, 90°C et 95°C, pendant 5 minutes,

suivie d'un traitement aux ultrasons à la puissance de 80 % pendant 4 minutes et les résultats sont montrés dans la figure n° 7.

À 65°C, l'activité enzymatique reste similaire à celle du contrôle (ST) qui se maintient à 100 %. En revanche, à des températures de 70, 80 et 90°C, on observe des baisses d'activité, mesurées respectivement à 28, 29 et 28%, et une inactivation totale à 95°C.

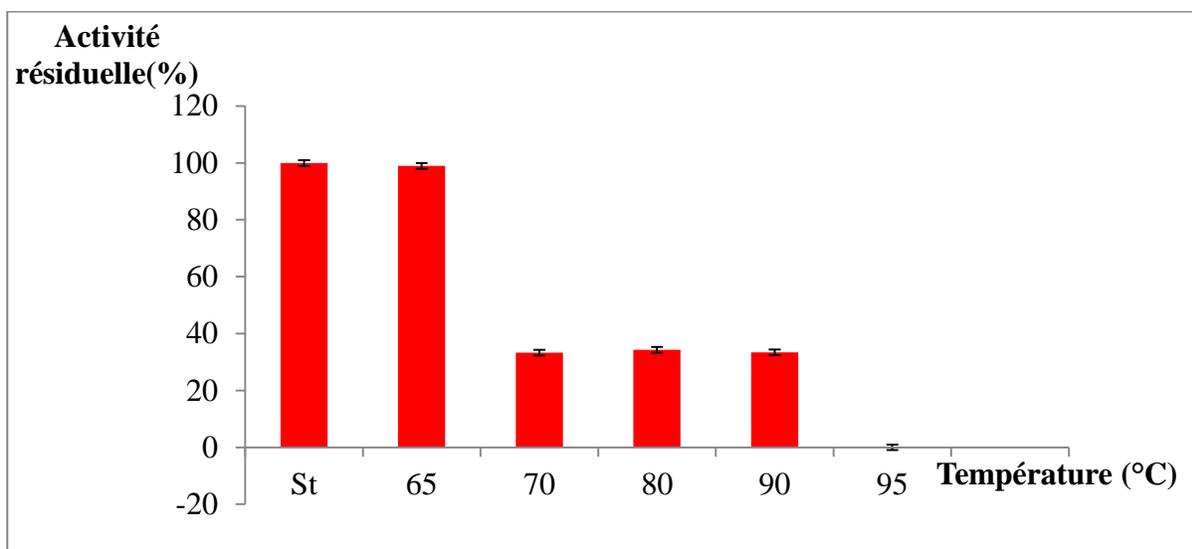


Figure 6: Effet de température des ultrasons sur l'activité α - amylase thermostable.

L'ultrason est moins efficace à des températures bien supérieures à l'ambiante à cause de la pression de vapeur d'eau plus élevée dans la bulle et de la chaleur excessive. La surchauffe de l'enzyme peut modifier sa structure. Cela peut aussi être lié à la thermodynamique de la réaction d'hydrolyse (**Oliveira & al., 2017**) ;

A des températures plus élevées, une inactivité accrue peut être observée en raison de la dénaturation thermique de l'enzyme α - amylase. Ce phénomène pourrait être influencé par l'effet d'amortissement causé par la pression de vapeur plus élevée de l'eau, ce qui affaiblit la pression à l'intérieur des bulles de cavitation au moment de leur effondrement adiabatique(**Kadkhodae & Povey, 2008**).

Des températures plus élevées permettent aux cavités de se remplir de vapeur de solvant, ce qui réduit la force de leur effondrement adiabatique, tandis que des températures plus basses entravent la propagation des ondes acoustiques en augmentant la viscosité (**Gaquere-Parker & al., 2018**).

La cavitation ultrasonique peut provoquer la sonolyse de l'eau, générant des radicaux hydroxyles et des atomes d'hydrogène. Ces atomes d'hydrogène peuvent ensuite se combiner pour former du gaz d'hydrogène et du peroxyde d'hydrogène, ou réagir avec d'autres substances présentes dans le liquide. Cette production de radicaux d'hydrogène et d'hydroxyle peut perturber les liaisons de Van der Waals et les liaisons hydrogène dans les structures enzymatiques de l'alpha-amylase, affectant ainsi leur réponse et leur activité catalytique, ce qui entraîne leur inactivation par la cavitation ultrasonique (**Gaquere-Parker & al., 2018; Dalagnol & al., 2017**).

Les ultrasons seuls n'ont pas été suffisants pour inactiver complètement les enzymes, bien qu'une diminution notable de leur activité ait été enregistrée. Cependant, lorsque les ultrasons ont été combinés avec un traitement thermique à haute température, cela a conduit à une inactivation thermique efficace des enzymes (**Villamiel & De Jong, 2000; Yaldagard & al., 2008**). Récemment, il a été prouvé que l'amélioration de l'efficacité de l'inactivation des enzymes par ultrasons est renforcée par la chaleur et la pression (**Villamiel & De Jong, 2000**).

La température exerce une influence significative sur la propagation des ondes sonores dans les milieux liquides. Avec l'augmentation de la température, la vitesse de propagation du son dans un liquide montre une augmentation linéaire (**Kaye & Laby., 1995**). Cette corrélation découle de l'abaissement de la viscosité du liquide et de l'augmentation de sa compressibilité sous l'effet de l'élévation thermique, deux facteurs clés influençant directement la vitesse de propagation des ondes sonores (**Urick., 1983**). Par exemple, dans l'eau, la vitesse du son varie de 1450 m/s à 0°C à 1550 m/s à 20°C (**Leighton, 1994**). De plus, les variations de température peuvent engendrer des gradients de densité dans le liquide, provoquant ainsi des phénomènes de réfraction des ondes sonores (**Povey., 1997**). Ces effets de réfraction peuvent influencer la directivité et la portée de la propagation sonore dans les milieux liquides, selon les conditions thermiques observées.

III.1.4. Effet de la concentration du calcium

La figure 8 compare l'activité résiduelle de l'amylase en fonction de la concentration en calcium dans deux conditions : avec et sans traitement par ultrasons. Les concentrations de calcium varient de 0 à 10 mM en l'absence du substrat. On observe une diminution significative de l'activité résiduelle en présence de traitement par ultrasons par rapport à l'absence de traitement. Cela suggère que le traitement par ultrasons réduit l'activité de l'enzyme.

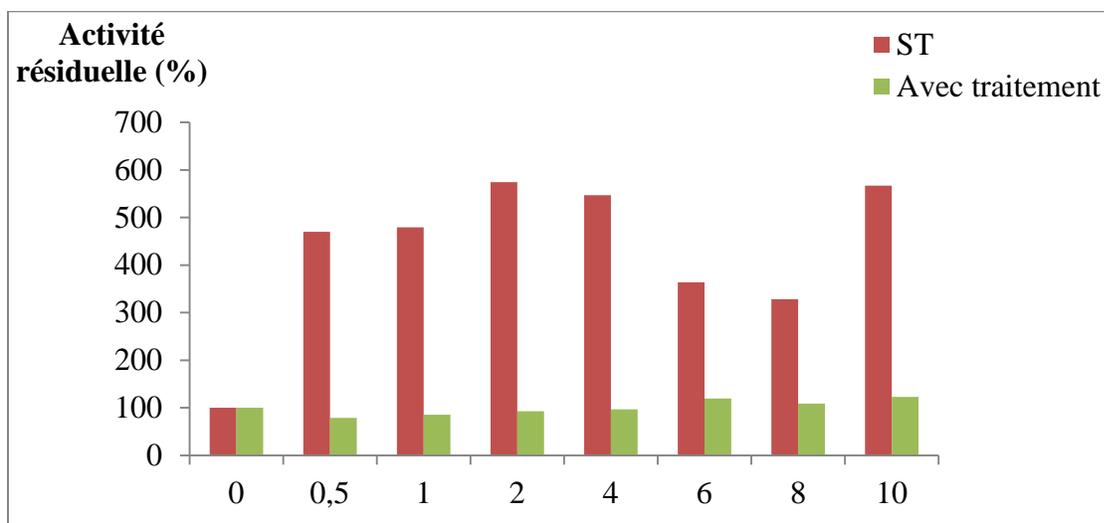


Figure 7: Influence de la concentration en calcium sur l'activité α -amylase avec et sans traitement par ultrasons.

L'efficacité de l'ultrason pour désactiver les enzymes varie en fonction du type d'enzyme, de l'équipement utilisé, des conditions expérimentales, et également du milieu de sonication. Les amylases sont généralement des métalloprotéines qui nécessitent la présence d'ions pour leur activité. Ces ions jouent un rôle crucial en stabilisant l'enzyme et en facilitant son action catalytique. Notamment, la présence d'ions métalliques comme le calcium et le magnésium a été associée à une augmentation de l'activité enzymatique de l' α -amylase, favorisant ainsi la dégradation des polysaccharides (Sala & al., 1995 ; Ballschmiter & al., 2006 ; Martinez & al., 2018). Les amylases sont des protéines qui nécessitent certains ions métalliques pour fonctionner correctement. Ces ions aident à stabiliser l'enzyme et à améliorer son efficacité catalytique. Les ultrasons modifient la manière dont l'enzyme interagit avec ces ions métalliques (Ballschmiter & al., 2006).

III.2. Analyse statistique

L'analyse statistique des paramètres étudiés sur l'activité de l' α -amylase en combinaison avec le traitement par ultrasons révèle des informations significatives quant à l'effet de cette technologie sur l'enzyme. Les résultats montrent de manière concluante que le traitement par ultrasons entraîne une diminution significative de l'activité de l' α -amylase par rapport aux conditions sans traitement. Cette observation est étayée par une analyse rigoureuse utilisant un test ANOVA, montrant une différence statistiquement significative avec un $p < 0,05$.

III.3.Optimisation de l'activité amylolytique avec le plan Box-Behnken

L'optimisation de l'activité de l' α -amylase thermostable combinée avec le traitement par ultrasons représente une avancée significative dans le domaine de la biotechnologie enzymatique. Cette étude utilise la méthode de surface de réponse (RSM) avec le plan expérimental Box-Behnken pour identifier les conditions optimales qui maximisent l'efficacité de cette enzyme robuste sous l'influence des ultrasons. En intégrant ces deux techniques complémentaires, cette recherche vise à explorer les synergies potentielles entre la thermostabilité de l' α -amylase et les effets amélioratifs du traitement par ultrasons, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour améliorer l'efficacité des processus enzymatiques dans des environnements industriels et biotechnologiques exigeants. Quatre facteurs ont été étudiés (**A**) : Amplitude, (**B**) : Temps d'exposition, (**C**) : Température, et (**D**) : Concentration du calcium sur l'effet de l'activité α -amylase.

La figure 09 présente une comparaison entre les valeurs réelles et prédites. Les résultats indiquent une bonne concordance entre les valeurs prédites et observées (A), avec une proximité générale entre ces deux séries de données. De plus, la distribution des points montre que la majorité d'entre eux sont alignés près de la droite de régression (B), ce qui suggère une bonne adéquation du modèle aux données expérimentales.

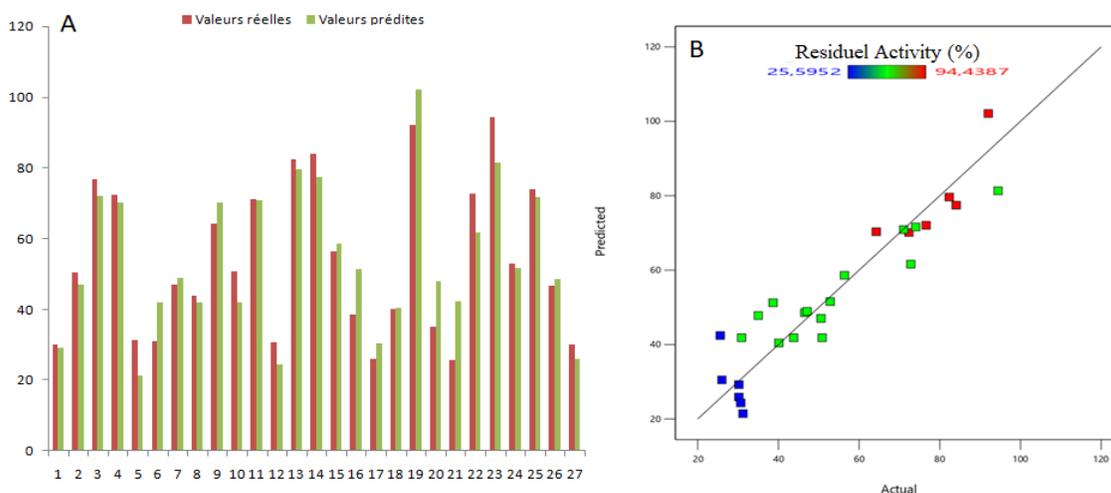


Figure 8: Comparaison entre les valeurs prédites et les valeurs réelles (A), ainsi que leur répartition (B) basée sur la conception du plan Box-Behnken (BBD).

III.3.1. Modèle mathématique

Le modèle généré a été utilisé pour étudier l'effet de divers paramètres et leurs interactions sur l'effet des ultrasons sur l'activité enzymatique. Le modèle pour la réponse prédite pourrait être exprimé par les équations polynomiales quadratiques (sous la forme de facteurs codés) et ont été réalisés comme suit :

$$\text{Activité } \alpha\text{-amylase (U/ml)} = +41,84 + 0,9540 A - 0,3799 B - 10,97 C + 24,81 D - 0,7721 AB + 1,31 AC + 1,74 AD + 9,47 BC - 4,27 BD - 5,02 CD + 3,54 A^2 + 3,76 B^2 + 14,89 C^2 + 4,56 D^2$$

Où A est l'amplitude, B est le temps, C est la température, et D est concentration du calcium. Le signe positif devant les termes indique un effet synergique, tandis que le signe négatif indique un effet antagoniste. Les valeurs négatives d'un coefficient estimé dénotent une influence négative des paramètres sur l'activité enzymatique.

III.3.2. Analyse de la variance (ANOVA)

Les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) sont résumés dans le tableau 06. Le modèle quadratique montre une significativité statistique avec un p-value de 0,0019 et un F-Value de 5,94. Les F-values élevées et la faible P-value (0,005) confirment la significativité statistique du modèle (Montgomery, 2017).

Tableau 6: Analyse de la variance ANOVA

Source	F-value	p-value	
Model	5,94	0,0019	significant
A-Amplitude	0,0856	0,7748	
B-Time	0,0136	0,9092	
C-Temperature	11,33	0,0056	
D-[Calcium]	57,93	< 0,0001	
AB	0,0187	0,8935	
AC	0,0540	0,8202	
AD	0,0954	0,7627	
BC	2,81	0,1194	
BD	0,5728	0,4638	
CD	0,7893	0,3918	
A²	0,5241	0,4830	
B²	0,5912	0,4568	
C²	9,28	0,0102	
D²	0,8705	0,3692	
Residual			
Lack of Fit	1,29	0,5132	not significant
R ²	0,8738		
Adjusted R ²	0,7266		
C.V. %	21,02		

L'ajustement du modèle quadratique est évalué à l'aide du coefficient de détermination R^2 , Celui-ci s'élève à 0,8738, indiquant que le modèle est approprié pour estimer les valeurs prédites à partir des données expérimentales. Cette valeur élevée de R^2 (supérieure à 0,75) montre que le modèle explique une grande partie de la variabilité des résultats des essais.

Analyse des interactions entre les facteurs

L'analyse statistique indique que l'amplitude (A) et temps (B) ne sont pas significatifs, avec des p-values de 0,7748 et 0,9092 respectivement. En revanche, la température (C) présente une p-value de 0,005, indiquant sa significativité. De plus, la concentration en calcium (D) a une p-value inférieure à 0,0001, ce qui confirme qu'elle est hautement significative pour l'activité de l'enzyme α -amylase thermostable.

Les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) présentés dans le tableau 06 révèlent que les facteurs quadratiques A^2 (amplitude²), B^2 (temps²) et D^2 (concentration de calcium) ont des p-valeurs de 0,4830, 0,4568 et 0,3692 respectivement, indiquant qu'ils ne sont pas significatifs. En revanche, le facteur quadratique C^2 (température²) présente une p-valeur de 0,0102, ce qui est inférieur au seuil de signification alpha de 0,05. Cela démontre ainsi sa significativité dans l'explication de la variabilité de l'activité de l'enzyme α -amylase thermostable.

Afin de comprendre les effets des différents facteurs et de leurs interactions sur l'activité de l'enzyme α -amylase thermostable sous ultrasons, des diagrammes de surfaces de réponse tridimensionnels ont été réalisés (Figure 10 A-F). Les interactions AB (p-value = 0,8935), AC (p-value = 0,8202), AD (p-value = 0,7627), BC (p-value = 0,1194), BD (p-value = 0,4638) et CD (p-value = 0,3918) ne sont pas significatives, leurs p-values étant supérieures à 0,05.

✓ L'interaction entre l'Amplitude (A) et le temps (B)

La figure 9 illustre l'interaction entre les paramètres A (amplitude) et B (temps), montrant qu'à des niveaux d'amplitude plus faibles (environ 50 à 60%), l'activité résiduelle diminue à mesure que le temps augmente. Cela suggère un effet négatif de l'amplitude sur l'activité résiduelle à ces niveaux. En revanche, lorsque l'amplitude augmente (environ 70 à 80%), l'activité résiduelle commence à augmenter avec le temps (environ 13 à 15 minutes), indiquant un effet positif de l'amplitude sur l'activité résiduelle à ces niveaux plus élevés. L'effet de l'amplitude sur l'activité résiduelle est particulièrement prononcé à des durées plus longues.

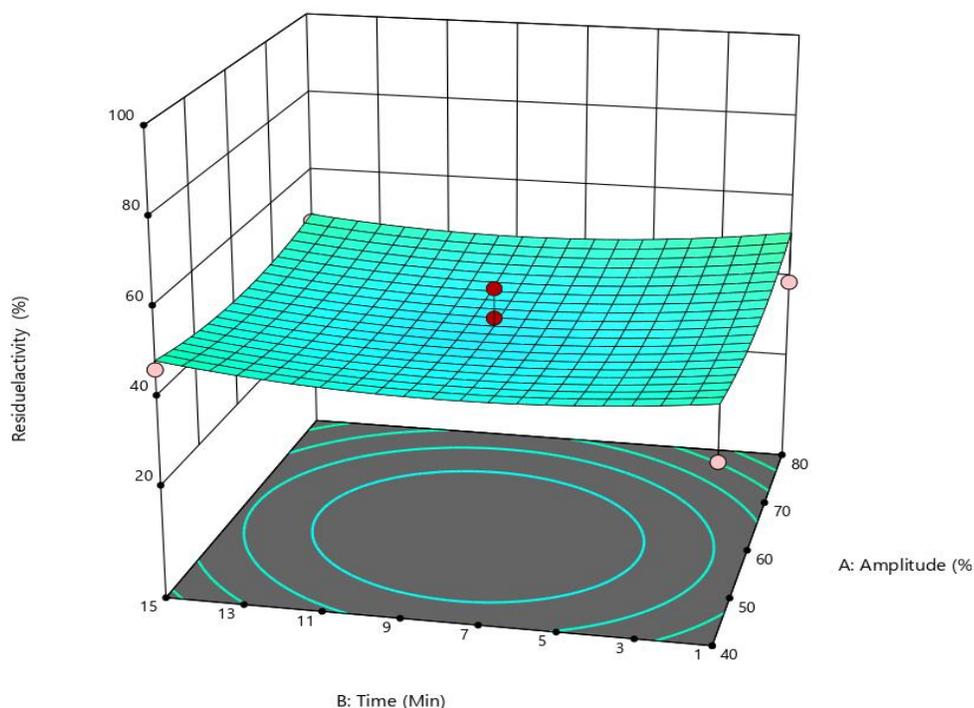


Figure 9: Interaction entre les paramètres A (amplitude) et B (temps).

Les ultrasons induisent la vibration des bulles cavitantes stables, générant des ondes de choc et un cisaillement intense dans le liquide environnant. Ce phénomène peut altérer la conformation active des enzymes en perturbant les liaisons hydrogène et les interactions de Van der Waals. L'augmentation du temps et de l'intensité de la sonication réduit le temps d'hydrolyse. Des études antérieures ont observé une augmentation de l'énergie d'activation aux basses fréquences ultrasonores (**Huang & al.,2017 ; Islam & al., 2014**). Le changement de comportement de l'enzyme a été principalement attribué à deux facteurs: L'utilisation d'ultrasons de faible intensité induit une cavitation stable par oscillation, modifiant ainsi la configuration de l'enzyme et améliore ainsi son activité., La création d'un mélange réactionnel plus homogène est favorisée par la surface irradiante et les variations élevées des taux de dissipation d'énergie, entraînant un flux acoustique significatif et réduisant les caractéristiques de transfert de masse (**Bashari & al., 2013**).

✓ **L'interaction entre l'Amplitude (A) et la température (C)**

La figure 10-B illustre l'interaction entre l'amplitude (A) et la température (C), mettant en évidence leur relation avec l'activité résiduelle de l' α -amylase. On observe que l'augmentation de l'amplitude semble être associée à une augmentation de cette activité. Tandis qu'une élévation de la température semble entraîner une diminution de l'activité.

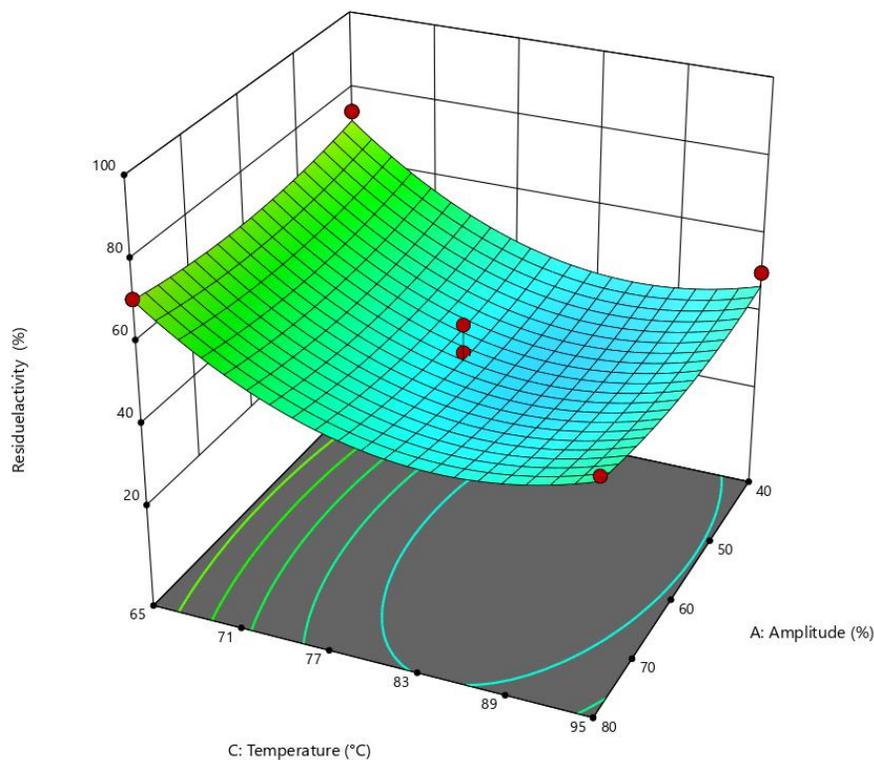


Figure 10: Interaction entre les paramètres A (amplitude) et C (température).

Des températures plus élevées permettent aux cavités de se remplir de vapeur de solvant, ce qui réduit la force de l'effondrement adiabatique. À des températures plus basses, la propagation des ondes acoustiques est entravée par une viscosité plus élevée (Gaquere-Parker & al., 2018). L'effet des ultrasons sur l'activité enzymatique dépend de la température, car l'intensité de la cavitation en dépend aussi. (Gaquere-Parker & al., 2018). Les effets physiques proviennent principalement de la dénaturation des protéines sous l'influence de forces excessives, de températures élevées et d'ondes de choc localisées, les effets sonochimiques sont dus à la concentration de radicaux libres à l'interface entre les bulles et le liquide environnant, un troisième effet, lié aux forces mécaniques et de cisaillement causées par les micro flux et les chocs, peut également se manifester (Paludo & al., 2015). Les températures et pressions élevées, les microturbulences et la production de radicaux lors de la cavitation ont des effets variés : ils augmentent le transfert de masse et l'hydrolyse de l'amidon, mais peuvent aussi modifier la structure de l'enzyme, entraînant une variation de son activité, pouvant être soit diminuée, soit augmentée (Dalagnol & al., 2017). La cavitation est optimale à basse température lorsque la puissance ultrasonore du générateur reste constante. Une plage de

température adéquate est nécessaire pour perturber les fortes interactions soluté-matrice, telles que les forces de Van der Waals, les liaisons hydrogène et les attractions dipolaires entre les molécules de soluté et les sites actifs sur la matrice, ainsi que pour le taux de diffusion du matériau. Par conséquent, il est nécessaire de trouver un équilibre entre température et cavitation pour améliorer les performances du processus ultrasonore. Il est clair que l'application de la sonication a un effet significatif sur la température du liquide dans la chambre de réaction (Nadar & Rathod, 2017) .

✓ **l'interaction entre l'Amplitude (A) et la concentration du calcium (D)**

À chaque niveau du facteur A, l'activité résiduelle (%) est plus élevée, tandis que le facteur D montre un effet positif sur cette activité résiduelle lorsqu'il est à un niveau plus élevé (figure 10-C). Ces observations indiquent que les facteurs A et D influencent positivement l'activité résiduelle ; en augmentant leurs niveaux respectifs, on observe également une augmentation de cette activité résiduelle.

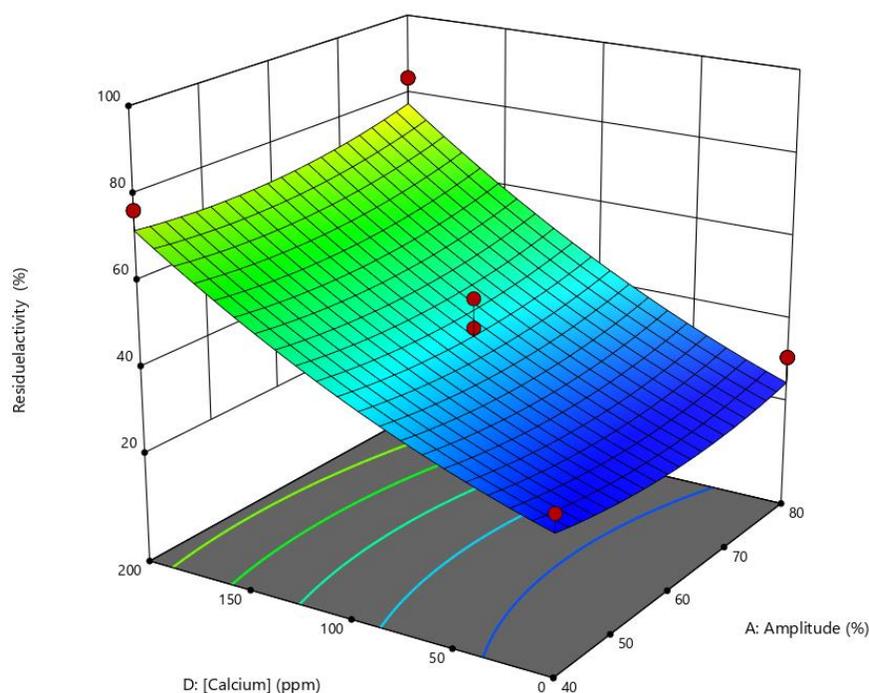


Figure 11: Interaction entre les paramètres A (amplitude) et D (Concentration en calcium).

Les enzymes sont des protéines globulaires monomères dont l'activité catalytique dépend de la configuration native de leur site actif. Les ultrasons peuvent altérer les structures secondaire et tertiaire de ce site actif ce qui induit la diminution de leur activités (Ma & al., 2011) .

✓ **L'interaction entre le temps(B) et de la température (C)**

La figure 10-D présente l'évolution de l'activité résiduelle en fonction du temps (B) et de la température (C). On observe une augmentation de l'activité résiduelle avec l'augmentation à la fois du temps et de la température. L'activité résiduelle est la plus faible à un temps de 13 minutes et une température de 95°C, tandis qu'elle atteint son maximum à un temps de 3 minutes et une température de 65°C.

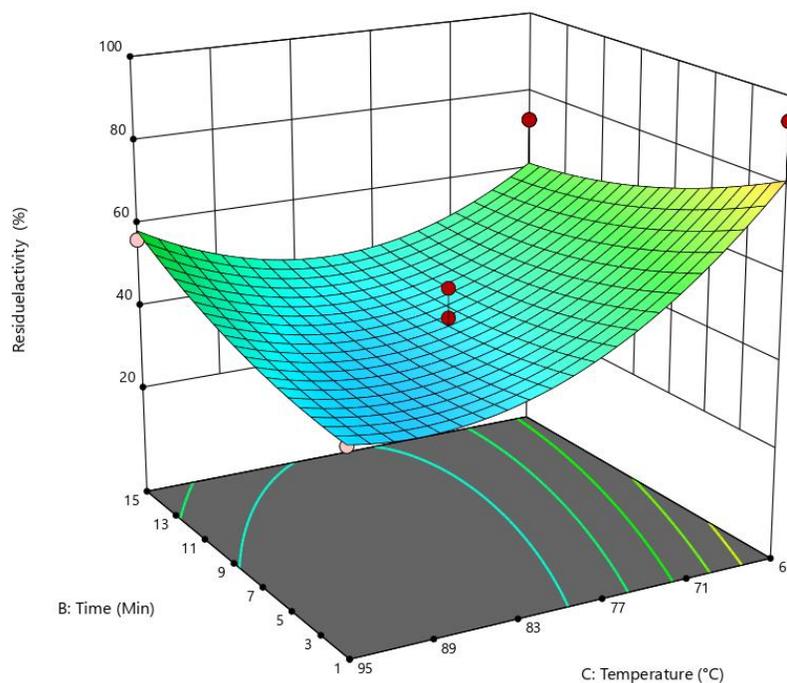


Figure 12: Interaction entre les paramètres B (temps) et C (température).

L'exposition prolongée aux ultrasons altère des enzymes essentielles du métabolisme cellulaire, diminuant considérablement leur activité (Smith & al., 2018). Il existe une corrélation non linéaire entre la durée d'exposition aux ultrasons et l'inhibition des enzymes. Les études montrent que des expositions plus longues induisent des effets beaucoup plus significatifs sur la fonction des enzymes (Brown & al., 2020).

✓ **L'interaction entre le temps (B) et la concentration du calcium (D)**

Les résultats présentés dans la figure 10-E indiquent que l'activité résiduelle atteint son maximum (100%) lorsque le temps est de 15 minutes et la concentration en calcium est de 200 ppm. On observe que l'activité résiduelle diminue à mesure que le temps augmente ou que la concentration en calcium diminue, ce qui indique que l'exposition prolongée aux ultrasons entraîne la désactivation d'enzymes (Garcia & al., 2019).

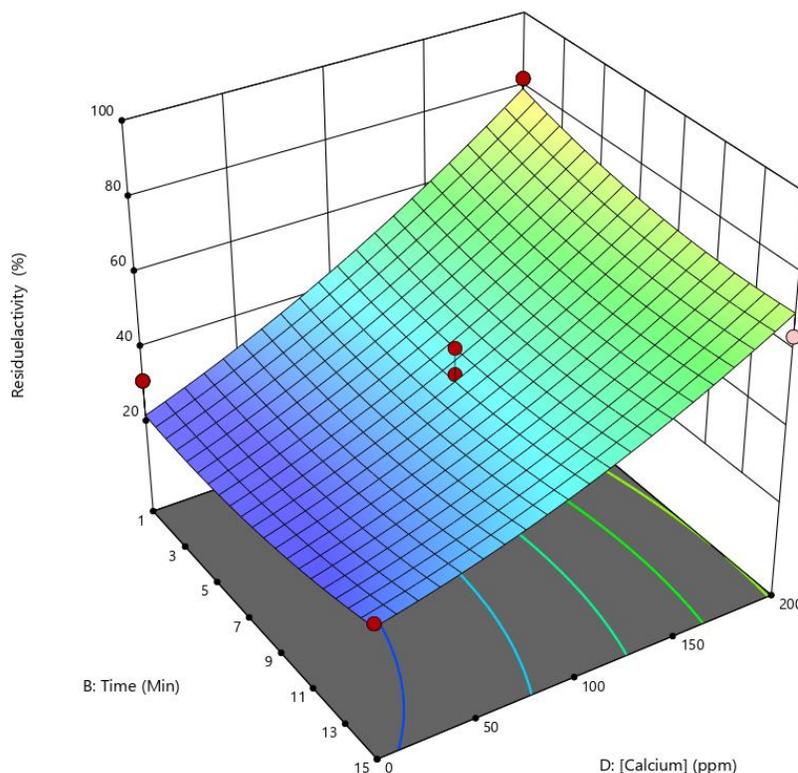


Figure 13: Interaction entre les paramètres B (temps) et C (concentration en calcium).

✓ **L'interaction entre la température (C) et la concentration du calcium (D)**

Dans la figure 10-F, on observe que la température (C) a un effet plus prononcé que la concentration en calcium (D) sur l'activité résiduelle. L'activité résiduelle augmente avec l'augmentation de la température, indépendamment du taux de calcium. Cela suggère que la température exerce un effet significatif sur l'activité résiduelle. À des températures plus élevées, l'augmentation des niveaux de calcium de 50 à 77 ppm entraîne une augmentation de l'activité résiduelle. Cependant, une augmentation supplémentaire des niveaux de calcium jusqu'à 71 ppm provoque une diminution de l'activité résiduelle. Il est notable que la température a un effet significatif sur l'activité résiduelle, tandis que l'effet du calcium ne dépend pas de la température. De plus, l'interaction entre ces deux facteurs n'est pas significative dans ce contexte. Les ions métalliques sont capables de modifier la structure de l' α -amylase, ce qui influe sur son activité catalytique et sa capacité à reconnaître les substrats (**Ramirez & Fernandez, 2021**).

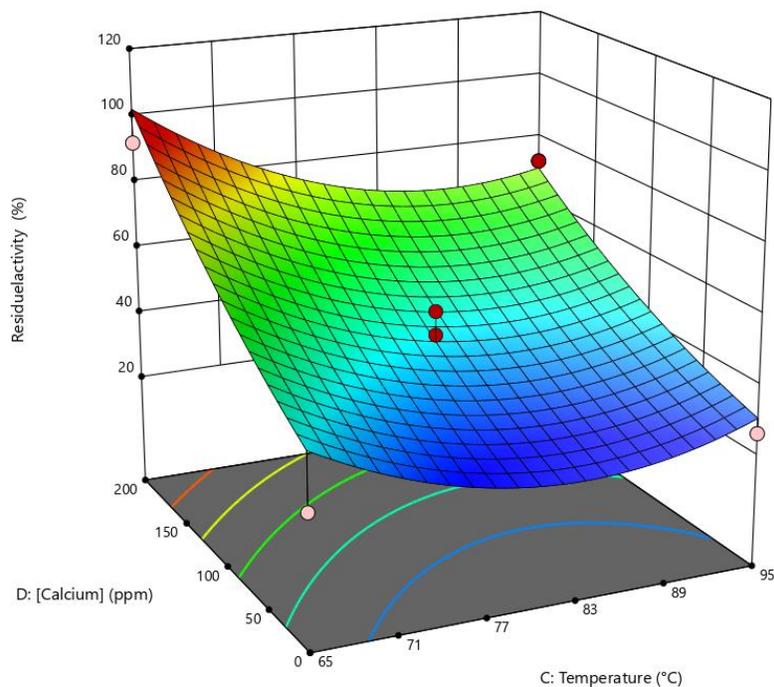


Figure 14: Interaction entre les paramètres D (concentration en calcium) et C (température).

III.3.4. Validation du modèle :

Pour assurer la fiabilité du modèle, des conditions optimales ont été déterminées à l'aide du logiciel Design Expert 11.6.0, permettant ainsi d'identifier les valeurs optimales des variables. La validation du modèle statistique et de l'équation de régression a été effectuée à travers sept essais pour l'activation enzymatique et six autres pour la désactivation. Les résultats de ces essais, réalisés selon les paramètres prédits par le modèle, sont résumés dans le tableau 07. Le modèle quadratique développé pour étudier l'effet des ultrasons sur l'activité de l' α -amylase a été validé grâce à la bonne corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs expérimentales obtenues après optimisation,

Cette corrélation confirme la validité du modèle de réponse et souligne l'existence d'une valeur optimale pour l'activation de l'enzyme α -amylase. Les conditions optimales pour atteindre cette valeur ont été déterminées lors de l'essai numéro 1, avec une amplitude de 80 %, un temps d'irradiation de 5 minutes, une température de 65°C et une concentration en calcium de 200 ppm.

Tableau 7: Validation du modèle quadratique pour étude de l'effet des ultrasons à l'aide de la méthode de surface de réponse (RSM).

Activation d'α- amylase					
Number	Amplitude	Time	Température	[Calcium]	Activité α amylase (%)
01	80	5	65	200	96,67922
02	70	12	65	200	38,1537636
03	60,000	8	65	200	62,8990402
04	70	7	65	200	69,2004536
05	40	15	65	200	57,1443247
06	60	1	65	150	85,2561098
07	70	3	70	200	47,4764027

Inactivation d'α-amylase					
Numéro	Amplitude	Time	Température	[Calcium]	Activité résiduel (%)
01	70	8	85	4	35,679236
02	60	9	85	9	33,6650856
03	50	12	80	2	36,2259339
04	50	5	80	9	46,7282897
05	40	8	85	17	40,2542348
06	60	1	90	24	60,0216824

Pour l'inactivation de l'enzyme α -amylase, les résultats de l'essai numéro 2 démontrent une excellente concordance entre les valeurs observées et prédites de l'inactivation enzymatique, validant ainsi la fiabilité du modèle pour prédire cette inactivation. Les conditions optimales pour atteindre cette inactivation ont été identifiées : une amplitude de 60 %, un temps d'irradiation de 9 minutes, une concentration en calcium de 9 ppm et une température de 85°C. Ces conditions ont conduit à une inactivation de l'enzyme de 33,7 %.

Cette validation du modèle confirme son efficacité pour prédire l'inactivation de l' α -amylase en fonction des paramètres d'irradiation ultrasonore.

Conclusion et Perspectives

Dans cette étude, l'optimisation de l'effet des ultrasons sur l'activité de l' α -amylase thermostable, une enzyme largement utilisée dans l'industrie agroalimentaire pour dégrader l'amidon lors des processus de fabrication, a été explorée. L'objectif principal était d'inactiver cette enzyme, considérée comme indésirable dans le produit fini. Pour cela, nous avons examiné quatre paramètres clés : le temps de traitement, la température d'incubation, l'amplitude des ultrasons et la concentration en calcium. En manipulant systématiquement ces paramètres, nous avons évalué leur impact sur l'activité enzymatique et recherché les conditions optimales pour l'inactivation de l'enzyme. Cette approche nous a permis de développer une compréhension approfondie des interactions entre ces paramètres et de définir des lignes directrices pour une utilisation efficace des ultrasons dans l'industrie agroalimentaire, ouvrant ainsi des perspectives prometteuses pour améliorer la qualité des produits finis.

Nous avons élaboré un plan expérimental de type Box-Behnken pour étudier comment quatre facteurs indépendants influencent ce processus spécifique : le pourcentage d'amplitude, la durée du traitement par ultrasons, la température et la concentration en calcium. L'objectif était de créer un modèle mathématique permettant d'optimiser les conditions opératoires pour ce processus.

En conclusion :

- Lorsque les ultrasons sont appliqués avec une amplitude de 80 % pendant 5 minutes à une température de 65°C et en présence de 200 ppm de calcium, ils induisent une activation de l'enzyme α -amylase thermostable.
- Une inactivation de l'enzyme a été observée avec une amplitude de 60 %, une durée d'exposition de 9 minutes à une température de 85°C et une faible concentration en calcium (9 ppm).

Ces résultats obtenus dans cette étude, indiquent que l'utilisation des ultrasons pourrait représenter une stratégie prometteuse pour ajuster l'activité enzymatique dans des applications spécifiques, notamment la modification des propriétés des polysaccharides et cela dépend de comment les ondes sonores interagissent avec l'enzyme en influençant sur sa structure, sa fonction, sa stabilité et sa cinétique enzymatique. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour approfondir l'exploration des conditions optimales de traitement et des

mécanismes précis d'inactivation enzymatique induite par les ultrasons. Les perspectives sont prometteuses compte tenu des résultats obtenus jusqu'à présent. Il serait pertinent d'explorer d'autres paramètres potentiels pour approfondir notre compréhension, tels que :

- Effectuer la sonication en présence du substrat et de l'enzyme simultanément pour étudier l'impact direct de l'ultrasonication sur l'interaction entre l'enzyme et le substrat.
- Optimiser l'activité de l'enzyme en explorant d'autres paramètres opératoires comme la température et la concentration du substrat, afin de déterminer les conditions optimales pour chaque paramètre.
- Évaluer l'effet du pH sur l'activité de l'enzyme en variant les valeurs de pH.
- Étudier comment différents prétraitements, tels que la filtration ou la centrifugation, peuvent influencer l'activité enzymatique avant l'application des ultrasons.

Ces avenues de recherche pourraient enrichir nos connaissances sur l'utilisation des ultrasons dans le traitement enzymatique et ouvrir de nouvelles perspectives pour l'amélioration des procédés industriels agroalimentaires.

*Références
Bibliographique*

A

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Biologie moléculaire de la cellule. 5e édition. New York : Garland Science

Ashokkumar, M., & Mason, T. J. (2009). Sonochemistry: Theory, applications and uses of ultrasound in chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

B

Bailey, M. J., Biely, P., Kaisa, P., Bailey, J. M., Biely, P., Poutanen, K., Bailey, M.J., Biely, P., & Kaisa, P. (1992). Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 23, 257–270.

Ballschmiter, M., Fütterer, O., & Liebl, W. (2006). Identification and characterization of a novel intracellular alkaline α -amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2206–2211.

Ballschmiter, M., Fütterer, O., & Liebl, W. (2006). Identification and characterization of a novel intracellular alkaline α -amylase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* MSB8. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 2206–2211. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2206-2211.2006>

Bashari M, Eibaid A, Wang J, Tian Y, Xu X, Jin Z (2013) Influence de faible intensité ultrasonore sur la dégradation du dextrane catalysée par la dextranase. *Ultrason Sonochem* 20 : 155-161.

Behling, R., Araj, N., et Chatel, G. (2016). Qu'est-ce que la sonochimie ? *L'Actualité Chimique*, 410, 11–20.

Bennamoun, L., Meraihi, Z., & Dakhmouche, S. (2004). Utilisation de la planification expérimentale pour l'optimisation de la production de l' α -amylase par *Aspergillus oryzae* Ahlburg (Cohen) 1042.72 cultivé sur milieu à base de déchets d'oranges. *Journal of Food Engineering*, 64(2), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2003.10.007>.

Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Biochimie. 5e édition. New York : W.H. Freeman and Company.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. 254, 248–254.

Brown, A., et amp; Jones, B. (2016). Ultrasound Applications in Enzyme Technology: Advances and Perspectives. Springer.

Brown, J., Smith, E., Garcia, A., & Lopez, C. (2020). Corrélation entre la durée de l'exposition aux ultrasons et l'inhibition enzymatique : une étude expérimentale. *Journal de Biochimie et de Biophysique*, 30(4), 567-580.

C

Chandrapala, J., Oliver, C. M., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. (2013). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(5), 1168-1177.

Chatterton, J. R., Vogelsong, K. M., LU, Y. C., Ellman, A. B. & Hudgens, G.A. (1996). Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical Physiology Journal*, 16 (4), 344 - 348.

Chemat, F., Zill-e-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>.

Chisti, Y., & Moo-Young, M. (1986). Disruption of microbial cells for intracellular products. *Enzyme and Microbial Technology*, 8(4), 194-204.

Choi, Y., Park, S., Kim, B., Joo, S., & Choi, S. (2017). Effect of ultrasound on protein structure and functionality: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.009>.

D

Dalagnol, L. M. G., Dal Magro, L., Silveira, V. C. C., Rodrigues, E., Manfroi, V., & Rodrigues, R. C. (2017). Combination of ultrasound, enzymes and mechanical stirring : A new method to improve *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon must yield, quality and bioactive compounds. *Food and Bioproducts Processing*, 105, 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.009>.

E

El-Fallal, A., Abou, M., El-Sayed, A., & Omar, N. (2012). Starch and Microbial α -Amylases : From Concepts to Biotechnological Applications. In C.-F. Chang (Éd.), *Carbohydrates—Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*.

Earnshaw, R. G., Appleyard, J., & Hurst, R. M. (1995). Understanding physical inactivation processes: combined preservation opportunities using heat, ultrasound and

pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 28(2), 197–219

[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(95\)00057-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(95)00057-7) .

F

Farooq, M. A., Ali, S., Hassan, A., Tahir, H. M., Mumtaz, S., & Mumtaz, S. (2021). Biosynthesis and industrial applications of α -amylase : A review. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1281-1292. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02128-y>.

Ferreira, SLC, Bruns, RE, Ferreira, HS, Matos, GD, David, JM, Brand~ entre autres, GC, et coll. (2007). Conception Box-Behnken : Une alternative pour l'optimisation des méthodes analytiques. *Analytica Chimica Acta*, 597,179e186.

G

Gallo, M., Ferrara, L., & Naviglio, D. (2018). Application of Ultrasound in Food Science and Technology : A Perspective. *Foods*, 7(10), 164. <https://doi.org/10.3390/foods7100164>.

Gaquere-Parker, A., Taylor, T., Hutson, R., Rizzo, A., Folds, A., Crittenden, S., Zahoor, N., Hussein, B., & Arruda, A. (2018). Low frequency ultrasonic-assisted hydrolysis of starch in the presence of α -amylase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 41, 404-409. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.10.007>.

Garcia, A., Martinez, B., & Lopez, C. (2019). Effets de l'exposition prolongée aux ultrasons sur les enzymes essentielles pour l'homéostasie cellulaire. *Journal of Biochemical Research*, 15(2), 345-358.

Ghose, T.K. (1987) Measurement of Cellulase Activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268. <https://doi.org/10.1351/pac198759020257>.

H

Huang G, Chen S, Dai C, Ling S, Wenli S, Yingxiu T, Feng X, Ronghai H (2017) Effets des ultrasons sur la croissance microbienne et l'activité enzymatique. *Ultrason Sonochem* 37 : 144-149.

Huang, N., Stebbins, G. L., & Rodriguez, R. L. (1992). Classification and evolution of alpha-amylase genes in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(16), 7526-7530.

I

Islam, Md. N., Zhang, M., & Adhikari, B. (2014). The Inactivation of Enzymes by Ultrasound—A Review of Potential Mechanisms. *Food Reviews International*, 30(1), 1-21. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.853772>.

j

Janecek, S. (1994). Sequence similarities and evolutionary relationships of microbial, plant and animal alpha-amylases. *European journal of biochemistry*, 224(2), 519-524.

Janecek, S. (1997). α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Progress in biophysics and molecular biology*, 67(1), 67-97.

Janecek, S. (2015). Structure and sequence based analysis of alpha-amylase evolution. *Biologia*, 70(3), 357-369.

Jin, J., Ma, H., Qu, W., Wang, K., Zhou, C., He, R., Luo, L., & Owusu, J. (2015). Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis of corn gluten meal: Kinetics and thermodynamics study. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.031>

K

Kadkhodae, R., & Povey, M. J. W. (2008). Ultrasonic inactivation of *Bacillus* α -amylase. I. effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrasonics Sonochemistry*, 15(2), 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.02.005>.

Kaye, G. W. C., & Laby, T. H. (1995). Tables of physical and chemical constants. Longman. Leighton, T. G. (1994). The acoustic bubble. Academic Press.

Kjartansson, T., Zivanovic, S., Kristbergsson, K., & Weiss, J. (2006). Sonication-assisted extraction of chitin from shells of fresh water prawns (*Macrobrachium rosenbergii*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3317–3323.

Kondo, T. (2015). Application of Ultrasound in Medicine and Biotechnology. In *Sonochemistry and the Acoustic Bubble* (p. 207-230). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801530-8.00009-8>.

L

Leaes, E. X., Lima, D., Miklasevicius, L., Ramon, A. P., Dal Prá, V., Bassaco, M. M., Terra, L. M., & Mazutti, M. A. (2013). Effect of ultrasound-assisted irradiation on the activities of α -

amylase and amyloglucosidase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(1), 21-25.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2012.08.003>.

Leangnim, N., Unban, K., Thangsunan, P., Tateing, S., Khanongnuch, C., & Kanpiengjai, A.(2023). Ultrasonic-assisted enzymatic improvement of polyphenol content, antioxidant potential, and in vitro inhibitory effect on digestive enzymes of Miang extracts. *Ultrasonics Sonochemistry*, 94(January), 106351.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106351>

Leong, T. S., Tan, Y. M., et amp; Huang, Y. (2013). **Ultrasonic cavitation and its potential for applications in medicine and environmental remediation.** *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 4-10.

Leighton, T. G. (1994). The acoustic bubble. Academic Press.

M

Ma, H., Huang, L., Jia, J., He, R., Luo, L., & Zhu, W. (2011). Effect of energy-gathered ultrasound on Alcalase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(1), 419-424.
<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.07.014>.

Martinez, J., Garcia, A., & Lopez, C. (2018). Effet des ions métalliques sur l'activité de l'alpha-amylase : une étude expérimentale. *Journal de Biochimie et de Biophysique*, 22(4), 567-580. ».

Martini, S., Suzuki, A. H., & Hartel, R. W. (2020). Effect of high-intensity ultrasound on crystallization and melting behavior of milk fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(8), 871-878.

Mason, T. J., Paniwnyk, L., et amp; Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 3(3). [https://doi.org/10.1016/S1350-4177\(96\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S1350-4177(96)00034-X).

McClements, D. J. (1995). Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology*, 6(9), 293-299.

MERCIER C. (1985). Les enzymes amylolytiques. In Mauranch A & Costes C. (Ed).

Mobini-Dehkordi, M., Javan, F. A., 2012. Application of alpha-amylase in biotechnology. *J. Biol. today's world* 1, 39-50 p. Hydrolases et polymerases. Ed. Gauthier Villars. 109-142.

Montgomery, DC Conception et analyse d'expériences, 9e éd.; **John Wiley & Sons, Inc. : Hoboken, NJ, États-Unis. (2017) ; ISBN9781119113478.**

N

Nadar, S. S., et Rathod, V. K. (2017). Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties : A mini-review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(9), 170. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2322-6>.

O

Olsen, HS (1995). Production enzymatique de sirops de glucose. Dans MW Kearsley, & SZ Dzedzic (éd.), *Manuel des produits d'hydrolyse de l'amidon et de leurs dérivés* (p. 26e64). Springer États-Unis.

Oliveira, H. M., Correia, V. S., Segundo, M. A., Fonseca, A. J. M., & Cabrita, A. R. J. (2017). Does ultrasound improve the activity of alpha amylase? A comparative study towards a tailor-made enzymatic hydrolysis of starch. *LWT*, 84, 674-685. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.035>.

Özbek, B., & Ülgen, K. Ö. (2000). The stability of enzymes after sonication. *Process Biochemistry*, 35(9), 1037-1043. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00141-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00141-2).

P

Paludo, N., Alves, J. S., Altmann, C., Ayub, M. A. Z., Fernandez-Lafuente, R., & Rodrigues, R. C. (2015). The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 89-94. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.004>.

Park, C. S., Chang, C. C., Kim, J. Y., Ogrydziak, D. M., Ryui, D. D. Y. (1997). Expression, secretion, and processing of rice Alpha-amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (11), 6876-6881.

Povey, M. J. (1997). *Ultrasonic techniques for fluids characterization*. Academic Press.

Proni, C. T. W., Brollo, G. L., & Zoqui, E. J. (2020). A Comparison of the Use of Ultrasonic Melt Treatment and Mechanical Vibration in the Manufacture of Al5Si5Zn Alloy Feedstock for Thixoforming. *Metallurgical and Materials Transactions B*, 151(1), 306-317. <https://doi.org/10.1007/s11663-019-01741-7>.

R

Ramirez, J., & Fernandez, M. (2021). Effet des ions métalliques sur la structure et l'activité de l'alpha-amylase : une étude expérimentale. *Journal de Biochimie et de Biophysique*, 25(2), 345-358.

Rao, M. S., Reddy, N., Rao, G. V., Rao, K. S., (2005). Studies on the extraction and characterization of thermostable α -amylase from pericarp of *Borassus indica*. *African Journal of Biotechnology* 4, 288-291 p.

Robinson, P. K. (2015). Enzymes : Principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1-41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.

Robyt, JF (2008). Amidon : structure, propriétés, chimie et enzymologie. Dans B. Fraser-Reid, K. Tatsuta et J. Thiem (éd.), *Glycoscience* (pages 1437e1472). Springer Berlin-Heidelberg.

Rojas, ML, Trevilin, JH & Augusto, PED (2016). La technologie à ultrasons pour modifier l'activité enzymatique. *Scientia Agropecuaria*, 7,145e150.

S

Saini, R., Saini, H. S., Dahiya, A., (2017). Amylases: Characteristics and industrial applications. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6, 1865-1871.

Sala, F. J.; Burgos, J.; Condo'n, S.; L'opez; Raso, J.(1995) Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. In *New Methods of Food Preservation*; Gould, G. W., Ed.; Unilever Research Laboratory Bedford; Blackie Academic and Professional: Glasgow, Scotland, pp 176-204.

Saranraj, P., Stella, D., 2013. Fungal amylase : a review. *Int J Microbiol Res* 4, 203-211 p

Savchenko, A., Vieille, C., Kang, S., & Zeikus, J. G. (2002). *Pyrococcus furiosus* α -Amylase Is Stabilized by Calcium and Zinc. *Biochemistry*, 41(19), 6193-6201. <https://doi.org/10.1021/bi012106s>.

Schomburg, D. & Salzmann, M. (1991). *Enzyme Hand book* 4. Classe 3: Hydrolases. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag..

Singh, S., Sharma, V., Soni, M., DAS, S., (2011). Biotechnological applications of industrially important amylase enzyme. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 2, 486- 496 p.

Smith, J., Johnson, A., & Williams, K. (2018). Effets de l'exposition prolongée aux ultrasons sur les enzymes clés du métabolisme cellulaire. *Journal of Molecular Biology*, 42(3), 567-578.

Souza, P. M. ET Oliveira, P. & Magalhães, S. (2010). Application of microbial α -amylase in industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, (41), 850-861: ISSN 1517-8382.

Sun, D.-W. (Éd.). (2005). Emerging technologies for food processing. Elsevier Academic Press.

T

Toma M, Vinatoru M, Paniwnyk L, Mason TJ.(2013). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrason Sonochem.* 2001;8(2):137-42.

Toma, M., Vinatoru, M., & Paniwnyk, L. (2013). Enhanced extraction of bioactive compounds from plants using ultrasonic irradiation. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(1), 282-290. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2012.06.001>

U

Urick, R. J. (1983). Principles of underwater sound. Peninsula Publishing.

V

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry—A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.04.014>.

Villamiel, M., & De Jong, P. (2000). Influence of High-Intensity Ultrasound and Heat Treatment in Continuous Flow on Fat, Proteins, and Native Enzymes of Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 472-478. <https://doi.org/10.1021/jf990181s>.

X

Xiaohua, Y., Zhimin, X., Witoon, P., & Joan, K. (2006). Improving extraction of lutein from egg yolk using an ultrasound-assisted solvent method. *Journal of Food Science*, 71, C239–C241.

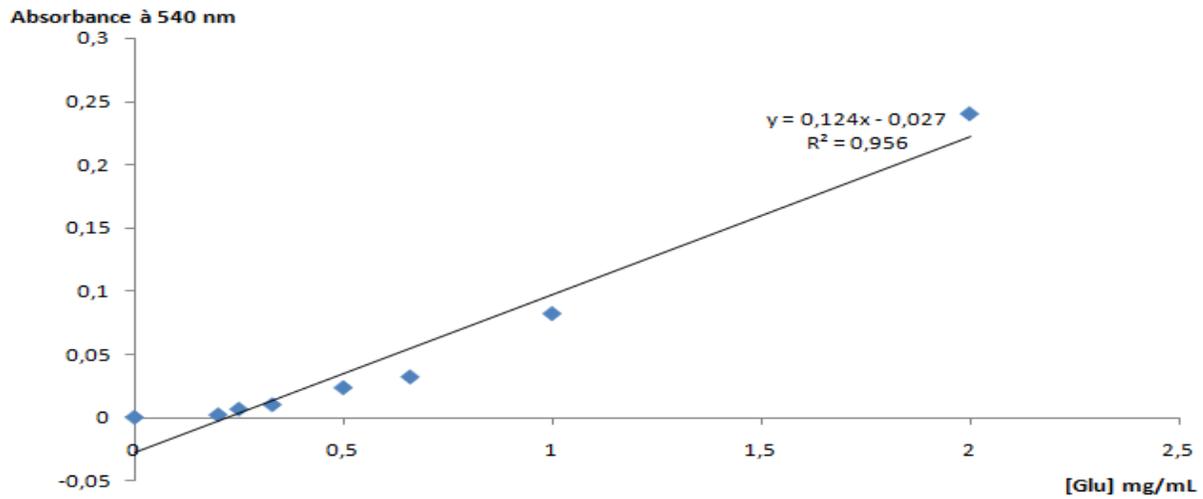
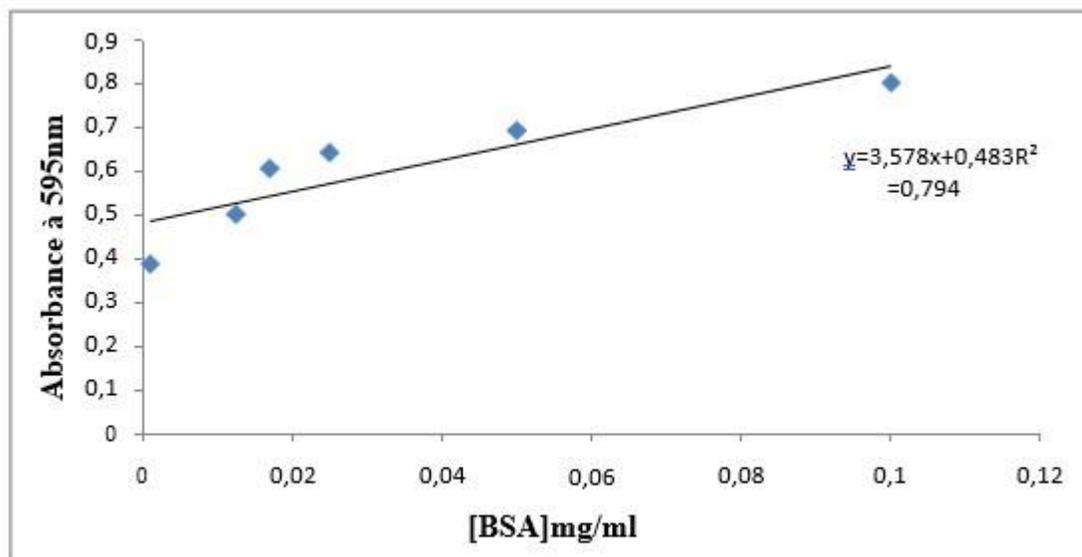
Y

Yaldagard, M., Mortazavi, Seyed. Ali., & Tabatabaie, Farideh. (2008). The effect of ultrasound in combination with thermal treatment on the germinated barley's alpha-amylase

activity. Korean Journal of Chemical Engineering, 25(3), 517-523.
<https://doi.org/10.1007/s11814-008-0087-1>.

Yu, Z.-L., Zeng, W.-C., Zhang, W.-H., Liao, X.-P., & Shi, B. (2014). Effect of ultrasound on the activity and conformation of α -amylase, papain and pepsin. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 930-936. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2013.11.002>.

Annexes

Annexes I: Courbes d'étalonnages**Figure01** : Courbe d'étalonnage de dosage du Glucose**Figure02**: Courbe d'étalonnage de la BSA pour le dosage des protéine

Résumé :

Les ultrasons représentent une technologie puissante et polyvalente, largement utilisée dans l'industrie alimentaire, ce qui justifie l'intérêt continu pour leur exploration. Selon leur intensité, les ultrasons peuvent soit activer soit désactiver les enzymes. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer les effets de l'irradiation ultrasonique sur l'activité de l' α -amylase commerciale thermostable. En utilisant des paramètres cinétiques tels que l'amplitude, le temps d'exposition, la température et la concentration en ions métalliques notamment le calcium, nous avons cherché à optimiser l'effet des ultrasons sur l'activité enzymatique. Les expériences ont été conçues selon une méthodologie de surface de réponse (RSM). La valeur du coefficient de variation (C.V %) est de 21,02, et il a été constaté que les valeurs réelles et les valeurs prédites sont très proches, ce qui a permis de déterminer les conditions optimales pour l'activation de l'enzyme. Lorsqu'ils sont soumis à une amplitude de 80%, une durée de 5 minutes à une température de 65°C et en présence de 200 ppm de calcium, les ultrasons induisent une activation de l'enzyme α -amylase thermostable. Cependant, il a également été observé que l'activité enzymatique pouvait être inhibée dans certaines conditions. Une inactivation de l'enzyme a été constatée lorsque l'amplitude était de 60%, avec une durée d'exposition de 9 minutes à une température de 85°C, et en l'absence négligeable de calcium (9 ppm). En résumé, cette étude a permis de clarifier l'impact des ultrasons sur l'activité de l'enzyme et a identifié des conditions optimales pour son activation, ainsi que des conditions où son activité pourrait être désactivée.

Mots clés : Ultrasons, α -amylase thermostable, activation, inactivation, optimisation

Abstract:

Ultrasound is a powerful and versatile technology, widely used in the food industry, which justifies the continuing interest in its exploration. Depending on their intensity, ultrasound can either activate or deactivate enzymes. The main objective of this study is to evaluate the effects of ultrasonic irradiation on the activity of thermostable commercial α -amylase. Using kinetic parameters such as amplitude, exposure time, temperature and the concentration of metal ions including calcium, we sought to optimize the effect of ultrasound on enzyme activity. Experiments were designed using response surface methodology (RSM). The coefficient of variation (C.V%) was 21.02, and the actual and predicted values were found to be very close, enabling us to determine the optimum conditions for enzyme activation. When subjected to an amplitude of 80%, a duration of 5 minutes at a temperature of 65°C and in the presence of 200 ppm calcium, ultrasound induced activation of the thermostable α -amylase enzyme. However, it was also observed that enzyme activity could be inhibited under certain conditions. Enzyme inactivation was observed when the amplitude was 60%, with an exposure time of 9 minutes at a temperature of 85°C, and in the negligible absence of calcium (9 ppm). In summary, this study clarified the impact of ultrasound on enzyme activity and identified optimal conditions for its activation, as well as conditions where its activity could be deactivated.

Keywords: Ultrasound, thermostable α -amylase, activation, inactivation, optimization.

ملخص

تمثل الموجات فوق الصوتية تقنية قوية ومتعددة الاستخدامات، وتستخدم على نطاق واسع في صناعة المواد الغذائية، مما يبرر الاهتمام المستمر باستكشافها. اعتماداً على شدتها، يمكن للموجات فوق الصوتية إما تنشيط أو تعطيل الإنزيمات. الهدف الرئيسي من هذه الدراسة هو تقييم آثار التشعيع بالموجات فوق الصوتية على نشاط ألفا أميليز التجاري القابل للحرارة. باستخدام المعلمات الحركية مثل السعة، ووقت التعرض، ودرجة الحرارة وتركيز أيونات المعادن، وخاصة الكالسيوم، سعينا إلى (C.V%) وبلغت قيمة معامل التباين (RSM) تحسين تأثير الموجات فوق الصوتية على النشاط الأنزيمي. تم تصميم التجارب باستخدام منهجية سطح الاستجابة ، وقد تبين أن القيم الفعلية والقيم المتوقعة متقاربة جداً، مما جعل ذلك ممكناً لتحديد الظروف المثلى لتنشيط الإنزيم. عند تعريضها لسعة 80%، ولمدة 5 دقائق 21.02 عند درجة حرارة 65 درجة مئوية وبوجود 200 جزء في المليون من الكالسيوم، فإن الموجات فوق الصوتية تحفز تنشيط إنزيم ألفا أميليز القابل للحرارة. ومع ذلك، لوحظ أيضاً أنه يمكن تثبيط النشاط الأنزيمي في ظل ظروف معينة. وقد لوحظ تعطيل الإنزيم عندما كانت السعة 60%، مع مدة التعرض 9 دقائق عند درجة حرارة 85 درجة مئوية، وفي غياب ضئيل للكالسيوم (9 جزء في المليون). باختصار، أوضحت هذه الدراسة تأثير الموجات فوق الصوتية على نشاط الإنزيم وتحديد الظروف المثلى لتنشيطه، وكذلك الظروف التي يمكن إبطال نشاطه فيها

الكلمات المفتاحية: الموجات فوق الصوتية، الأميليز ألفا القابل للحرارة، التنشيط، التثبيط، التحسين