

Module : Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique
TP développer par Dr. BENGUERAICHI F et enseigner par Dr. Deghima A.
2^{ème} Master BFA et MFA

TP 1 : Extraction de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

Introduction

Au cours des dernières années, l'exploitation des microorganismes, essentiellement les bactéries et les levures ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels.

Les levures comme *Saccharomyces cerevisiae* constituent une source importante de biosynthèse protéique très active, représentée par diverses classes d'enzymes utilisées en industrie. Le genre *Saccharomyces* a un rôle important dans le domaine alimentaire où il fait l'objet d'une production de masse pour servir soit de levure de boulangerie soit pour la production d'enzymes.

L'ingénierie de cette levure a permis la production de l'invertase, une enzyme endocellulaire obtenue par lyse cellulaire. En effet, l'intérêt grandissant vers cette enzyme est justifié par de nombreuses applications industrielles. L'invertase est une hydrolase qui catalyse l'hydrolyse du saccharose alimentaire en fructose et en glucose; ce mélange est appelé sucre inverti, d'où le nom de l'enzyme.

But

- ✓ Extraction de l'invertase de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
- ✓ Détermination de la teneur en protéines de l'extrait brut de l'enzyme ;
- ✓ Démonstration de l'activité enzymatique de l'extrait brut.

Mode opératoire

I. Extraction de l'enzyme

L'extraction de l'invertase se fait par plasmolyse suivie d'autolyse assistée, c'est-à-dire de digestion par enzyme protéolytique. L'extraction de l'invertase consiste en la succession des étapes suivantes :

- Préparer 100 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 0,1M et d'acétate sodium 0,01M.
- Ajouter 50 g de levure de boulanger sèche, puis couvrir et agiter jusqu'à la dissolution de la levure.
- Laisser 45 heures à température ambiante (plasmolyse).
- Ajouter après 100 ml d'eau distillée et bien homogénéiser.
- Centrifuger à 4000 tr/min pendant 15 minutes puis récupérer le surnageant et y ajouter de l'acide acétique pour acidifier la préparation jusqu'à un pH de 4 environ (l'acide acétique est employé comme conservateur).
- Centrifuger cette préparation une deuxième fois à 4000 tr/min pendant 15 minutes et récupérer le surnageant qui contient la plupart de l'enzyme en ajustant le pH à 4 de nouveau si nécessaire.
- L'extrait enzymatique ainsi obtenu est limpide et de couleur jaune. Il est conservé à 4°C.

II. Dosage des protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet

Les protéines ont une absorption maximale dans le domaine d'ultraviolet à 280 nm, due aux chaînes latérales de leurs acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane).

La méthode de Warburg et Christian (1941) requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'ondes (280 nm pour les protéines et 260 nm pour les acides nucléiques). Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation suivante:

$$[\text{Protéines}](\text{g/l}) = 1,55 A_{280\text{nm}} - 0,76 A_{260\text{nm}}$$

La mesure de l'absorbance dans l'ultraviolet est effectuée à partir des dilutions suivantes de l'extrait d'invertase.

Numéro du tube	1	2	3
Facteur de dilution			
Volume de l'extrait d'invertase (ml)	1	2	3
Volume de tampon acéto-acétique (ml)	19	18	17

L'absorbance est mesurée pour chaque dilution de la solution mère enzymatique à 280 nm et à 260 nm.

III. Démonstration de l'activité enzymatique

Dans une série de tubes à vis, on fait réagir 2 ml de saccharose à 0,1M dans du tampon acétate (0,1M - pH 4,6) et 0,5ml (une dilution 1/150) de la solution d'enzyme. La réaction enzymatique se déroule à 25°C pour les durées d'incubation suivantes : 0, 1, 2, 3 minutes.

Prélever 0,5 mL du milieu réactionnel + 0,5 ml de la liqueur de Fehling

Préparation du tampon acéto-acétique

Pour préparer le tampon acéto-acétique 0,1M – pH 4,6, utilisé comme solvant de l'invertase et de son substrat (saccharose), il faut procéder à la préparation des solutions suivantes :

Solution « A » d'acide acétique 0,2 M : 11,55 ml de CH₃COOH dilués dans 1000 ml d'eau distillée.

Solution « B » d'acétate de sodium 0,2M : 27,2g C₂H₃O₂Na.3H₂O dissous dans 1000 ml d'eau distillée.

Mélanger 25,5 ml de la solution « A » et 24,5ml de la solution « B », compléter à 200 ml avec de l'eau distillée pour obtenir une solution tampon à 0,1M de pH 4,6.