

Module : Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique  
2<sup>ème</sup> Master BFA et MFA

## TP 2 : Dosage des sucres Réducteurs

### Introduction

Il est très difficile de mesurer directement la concentration d'enzyme dans un milieu donné, car cette dernière se trouve rarement à l'état pure. Dans ce cas on mesure plutôt une grandeur proportionnelle à la concentration d'enzyme qui est l'activité enzymatique. L'activité d'une enzyme se traduit par une quantité de substrat transformée ou produit apparu au cours du temps, qui s'exprime par des Unité international (UI) ou Katal (kat).

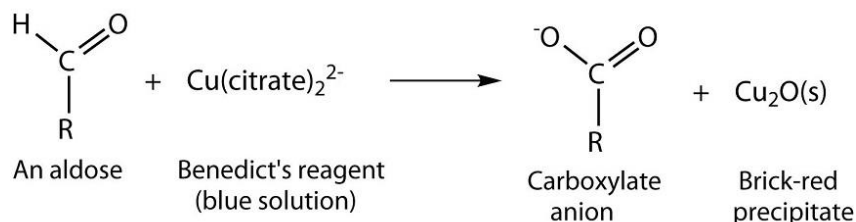
**L'Unité Internationale (UI)** est la quantité d'enzyme requise pour convertir 1  $\mu\text{mol}$  de substrat en produit en 1 min à une température et pH spécifiés (ex. pH 7.0 et 25°C) et sous des conditions de saturation du substrat :  $\text{UI} = 1\text{-}\mu\text{mol}$  substrat consommé/min.

**Le katal (kat)** est l'unité d'activité catalytique. C'est la quantité d'enzyme qui transforme 1 mole de substrat par seconde. Il existe une relation entre l'UI et le katal :

$$1 \text{ UI} = 1 \mu\text{mol}/\text{min} = 16,69 \text{ nmol}/\text{s} = 16,67 \text{ nkat}$$

### Etape 1 : Préparation de la gamme d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteurs

L'hydrolyse du saccharose (sacre non réducteur) libère deux sucres réducteurs (le Glucose et le Fructose). En incubant la solution de saccharose avec le réactif de Benedict, les deux sucres réducteurs produits, vont le réduire. On obtient le cuivre réduit qui absorbe la lumière à 740 nm. **Cette absorbance est donc proportionnelle à la quantité de glucose et fructose libérée et par conséquent proportionnelle à la quantité de saccharose hydrolysé.**



- 1- Préparez une solution mère équimolaire de Fructose 5g/L + Glucose 5 g/L (Saccharose hydrolysé ou sucre inverti).
- 2- Dans 8 tubes (A, B, C, D, E, F, G, H), préparez 5 dilutions en série de la solution mère
- 3- Dans une série de tube numéroté de 1 à 9 mettez 0.5 mL des différentes solutions

- 4- Ajoutez 1 mL du réactif Benedict
- 5- Incubez les tubes dans un bain-Marie bouillant pendant 5 min, ensuite il faut refroidir les tubes rapidement dans un récipient d'eau glacée
- 6- Centrifugez les tubes à 4000 tr/min pendant 3 min
- 7- Mettez 0.5 ml du surnageant dans un autre tube et ajoutez 2 ml d'eau distillée.
- 8- La densité optique du contenu de chaque tube est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 740 nm.

**- Calculez la quantité de sucres réducteurs en micromoles dans chaque tube**

**- Représentez graphiquement sur papier millimétré la DO à 740 nm en fonction de la quantité de sucres réducteurs en micromoles dans chaque tube.**

Tube	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sacharrose hydrolysé 10 mM (ml)	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Réactif Benedict (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Incubation 100 °C	5 min								
Refroidissement 4 °C	2 min								
Absorbance 740 nm	0								
Sucres réducteurs en $\mu$ moles									

**La Gamme d'étalonnage du TP2 sera utilisée dans le TP 3 pour la mesure de l'activité enzymatique de l'invertase**