

Module : Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique
2^{ème} Master BFA et MFA

TP 2 : Mesure de l'activité enzymatique de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

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'exprimé par des Unité international (UI) ou Katal (kat).

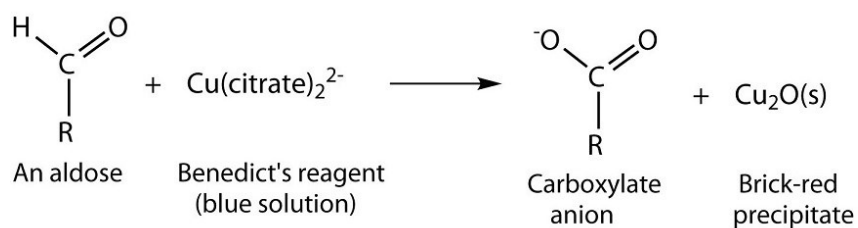
L'Unité International (UI) est la quantité d'enzyme requise pour convertir 1µmol de substrat en produit en 1 min à une température et pH spécifiés (ex. pH 7.0 et 25°C) et sous des conditions de saturation du substrat : UI = 1-µmol substrat consommé/min.

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 (sucre 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 5 tubes (A, B, C, D, E), préparez 5 dilutions en série de la solution mère
- 3- Dans une série de tube numéroté de 1 à 6 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
Sacharrose hydrolysé 10 mM (ml)	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Réactif Benedict (ml)	1	1	1	1	1	1
Incubation 100 °C	5 min					
Refroidissement 4 °C	2 min					
Absorbance 740 nm	0					
Sucres réducteurs en μmoles						

Etape 2 : Détermination de l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique du TP 1

1- Préparez une dilution 1/100 de l'extrait enzymatique du TP 1

2- Préparez une dilution saccharose à 0,1 M dans du tampon acétate (0.1 M - pH 4.6)

Tube	7	8	9	10	11	12
Sacharrose 0.1 M (ml)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Extrait enzymatique 1/100	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Incubation à 25 °C (min)	0	2	4	6	8	10
Réactif de Benedict (ml)	1	1	1	1	1	1
Incubation 100 °C	5 min					
Centrifugation 4000 tr/min	3 min					
Diluez 0.5 ml surnageant + H ₂ O (ml)	2	2	2	2	2	2
Absorbance 740 nm	0					
Sucres réducteurs en μmoles						

- Pour le temps 0 (Tube 7, blanc réactif), mettre dans l'ordre : 0.5 ml réactif bededict, 0.4 mL solution de saccharose puis 0.1 mL d'extrait enzymatique

- Après 2 minutes de réaction, retirer le tube 8, y ajouter 1 ml du réactif Benedict et agiter au vortex pour bien arrêter la réaction. Déposer le tube sur la paille.
- Répétez la même opération avec les tubes 9, 10, 11, et 12 respectivement, puis agiter.
- Après avoir régler le zéro de DO du spectrophotomètre avec la solution du tube 7 (témoin), mesurez les DO à 740 nm des autres tubes (8 à 12).
- **Rapporter les DO obtenues aux différents temps de réaction sur la droite de la gamme étalon des sucres réducteurs pour obtenir la quantité de sucres réducteurs (en μmoles) aux différents temps de réaction.**
- **Tracer la courbe représentant la quantité de sucres réducteurs (en μmoles) en fonction du temps de réaction.**
- **Déterminer à partir de cette courbe la vitesse initiale (v_i) en μmoles de sucres réducteurs libérés par minute, pour la concentration de saccharose égale à 0.1 M.**
- **Calculer la vitesse initiale en μmoles de saccharose hydrolysé par minute (UI) trouvée pour la concentration de saccharose égale à 0,1 M.**
- **Déterminer le nombre d'UI contenu dans 1 ml d'extrait F non dilué.**