

TP1 : La préparation de la gamme d'étalon des sucres réducteurs

Introduction

Les levures comme *Saccharomyces cerevisiae* constituent une source importante de biosynthèse protéique très active, représentée par diverses classes d'enzymes utilisées en industrie. L'ingénierie de cette levure a permis la production de l'invertase, une enzyme endocellulaire obtenue par la lyse cellulaire. L'invertase est extraite à partir de la levure de boulangerie et hydrolyse le saccharose en fructose et en glucose, ces derniers sont des sucres réducteurs. Son activité est déterminée par mesure de la quantité de sucres réducteurs (fructose + glucose) formés au cours de la réaction en utilisant la méthode du réactif DNS (acide 3,5-dinitrosalicylique). En milieu alcalin, à chaud et en présence de sucres réducteurs, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) est réduit en acide 3-amino-5-nitro-salicylique, produit de couleur jaune orangé absorbant à 540 nm.

Produits chimiques, matériels et appareillage

- Acétate de sodium
- Acide acétique concentrée
- Réactif de DNS
- Glucose, fructose et saccharose
- Pissette d'eau distillée
- Balance analytique
- Bain marie bouillant
- Centrifugeuse
- Agitateur
- Vortex
- Eprouvette graduée
- Bêchers et erlenmeyers
- Tubes à centrifuger
- Bandelettes de test pH (1-14)

Dosage des sucres réducteurs



Mode opératoire

✓ Préparation de la gamme étalon de sucres réducteurs

Préparez une gamme étalon de concentrations connues de sucres réducteurs. La solution mère de sucre inverti à 5 mmol/l (2.5 mmol/l de glucose + 2.5 mmol/l de fructose) est utilisée pour servir de référence dans le dosage des sucres réducteurs en utilisant un tampon acétate 0,1M-pH 4,6 comme solvant. Le témoin est le tube 0. La réalisation de cette gamme étalon est faite selon le tableau 1.

Tableau 1 : Préparation de la gamme étalon de sucres réducteurs.

N° du tube	Gamme d'étalon										
Tube	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solution équimolaire de glucose et fructose à 5 mmol (ml)	00	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Eau distillée	1	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0
Tampon acétate 0.1 M, pH 4.6 (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Solution de saccharose 0.1M (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DNS (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Chauffage	Boucher et vortexer et porter au bain marie bouillant 100°C pendant 5 min										
Refroidissement	5 min à 4°C										
Eau distillée (mL)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
DO à $\lambda = 540\text{nm}$											

- Préparer la gamme étalon à différentes concentration (de 1 à 10).
- Traitez ces solutions avec le DNS, puis lisez les absorbances de la gamme d'étalon à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- Sur une feuille millimétrique (+Excel), représenter graphiquement la courbe d'étalonnage DO en fonction de la quantité de sucres réducteurs en μM dans chaque tube.
- Sachant que le réactif DNS nécessite un milieu fortement alcalin et chaud pour réagir avec les sucres réducteurs. Quel est l'intérêt d'utiliser un tampon acétate à pH 4.6 dans la préparation de la gamme d'étalonnage ?