

TP2 : Extraction de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* et l'étude de la cinétique enzymatique de la transformation du saccharose en sucre inverti, catalysée par l'invertase

Introduction

L'invertase est extraite à partir de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* 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, materials et appareillage

- Levure de bière
- Bicarbonate de sodium
- 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
- Tubes à essai
- Bandelettes de test pH (1-14) ou pH-mètre
- Extrait enzymatique dilué

1. Préparation de l'extrait de levure

Mode opératoire

- Dans un bécher de 250 mL, introduire 100 mL d'une solution aqueuse qui contient 0,1M de bicarbonate de sodium (8,40 g) et 0,01M d'acétate de sodium (16,40 g).
- Ajouter 50g de levure *Saccharomyces cerevisiae*.
- Couvrir le bécher avec du papier aluminium et agiter jusqu'à la dissolution totale de la levure.
- Laisser reposer à température ambiante pendant 45 heures.
- Ajouter 100 mL d'eau distillée et bien homogénéiser.
- Centrifuger la solution à 4000 tr/min pendant 12 minutes.

- Récupérer le surnageant et y ajouter de l'acide acétique pour acidifier la préparation jusqu'à pH 4,0, l'acide acétique est employé comme conservateur
- Centrifuger cette dernière solution à 4000 tr/min pendant 12 minutes et récupérer le surnageant qui contient la plus grande partie de l'enzyme, en ajustant de nouveau, le pH à 4 si nécessaire.
- L'extrait enzymatique obtenu est relativement limpide et de couleur jaune. Il est conservé à 4°C pour éviter la formation de tout trouble ou inactivation avec le temps.

2. Etude de la cinétique enzymatique de la transformation du saccharose en sucre inverti, catalysée par l'invertase

- Cette expérience est réalisée dans des conditions définies ($\text{pH}=4.6$, $T^{\circ}=30^{\circ}\text{C}$). Des quantités constantes d'enzyme diluée et de substrat sont mises en contact à des temps variables. On suit la formation du P en fonction du temps. La zone pendant laquelle la vitesse est constante, correspond aux conditions initiales, et permet la détermination de la vitesse initiale de la réaction.
- Chaque groupe devra travailler sur une dilution indiquée (1/50).
- Préparer une solution de saccharose à 0.1 mol /l.
- La réalisation de cette expérience est faite selon le tableau 1.
- Réglez le bain marie à 30°C .

Mode opératoire

[illegible]

3. Travail à faire

- Lisez les absorbances de la gamme d'étalon à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- Calculer la vitesse initiale V_i
- La courbe d'étalonnage ou son équation permet ensuite de convertir les absorbances mesurées lors de votre expérience cinétique (les 5 tubes pour chaque concentration de saccharose) en concentrations de sucre inverti (produit formé). Cette courbe relie l'absorbance mesurée à la concentration de sucre inverti.
- Une fois que vous avez les concentrations, déterminez la vitesse initiale V_i en calculant la pente initiale de la partie la plus linéaire de chaque graphique [sucre inverti] = f(t). La pente représente la variation de la concentration de sucre inverti par unité de temps, avec l'unité mol/L/min. La formule de la vitesse initiale est : $V_i = \Delta[\text{sucre}\backslash \text{inverti}] / \Delta t$ et l'unité de la vitesse calculée en $\mu\text{mol/L/min}$.
- Calculer la concentration initiale du substrat $[S]_0$
- Tracer la courbe de Michaelis-Menten ($V_i = f([S]_0)$)
- Tracer la courbe de Lineweaver-Burk ($1/V_i = f(1/[S]_0)$). Déterminer V_{max} et K_m .

Notes :

1. Comment la pente représente-t-elle la vitesse ?

Pente = $\Delta y / \Delta x$ = Changement sur l'axe vertical / Changement sur l'axe horizontal

$V_i = \Delta \text{produit} / \Delta t$

Δy représente la concentration de sucre inverti ([produit], en $\mu\text{mol/L}$).

Δx représente le temps (en minutes).

2. Comment calculer S_0

Le calcul de la concentration initiale finale de saccharose ($[S]_0$) dans chaque tube se fait généralement en utilisant la formule de dilution :

$C_{\text{mère}} \times V_{\text{mère}} = C_{\text{finale}} \times V_{\text{total}}$

Où :

- ✓ $C_{\text{mère}}$ est la concentration de la solution mère de saccharose.
- ✓ $V_{\text{mère}}$ est le volume de la solution mère ajouté dans un tube spécifique
- ✓ C_{finale} est la concentration finale dans le tube, qui correspond à notre
- ✓ V_{total} est le volume total final dans ce même tube après l'ajout de tous les réactifs (saccharose, eau, tampon, enzyme, etc.).