

Module : Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique

TP développer par Dr. BENGUERAICHI F. et enseigner par Dr. Deghima A.

2<sup>ème</sup> 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'exprime par des Unité international (UI) ou Katal (kat).

**L'Unité International (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 :

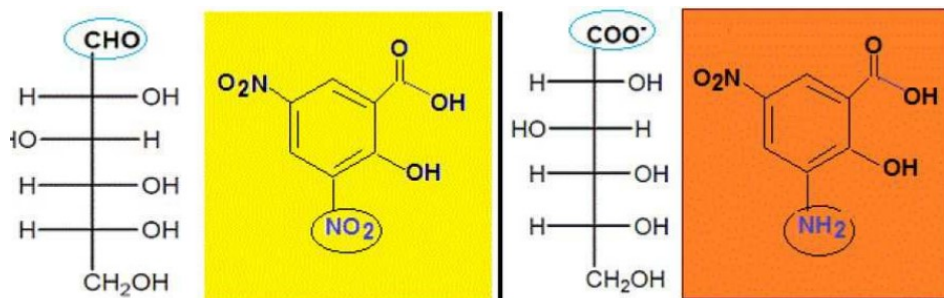
UI = 1- $\mu\text{mol}$  substrat consommé/min.

**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 UI = 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  = 16,69 nmol/s = 16,67 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 DNS, les deux sucres réducteurs produits, vont le réduire. On obtient le DNS réduit qui absorbe la lumière à 540 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 2.5 mM + Glucose 2.5 mM (Saccharose hydrolysé ou sucre inverti à 5 mM).
- 2- Dans 5 tubes, préparez 5 dilutions en série de la solution mère
- 3- Dans une série de tube numéroté de 1 à 6 mélangez 0.375 µL des différentes solutions avec 0.25 mL du tampon acéto-acétique (0.1M – pH 4.6)
- 4- Ajoutez 0.5 mL du réactif DNS
- 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 puis ajouter 5 mL d'eau distillée dans chaque tube.
- 6- La densité optique du contenu de chaque tube est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 540 nm, contre un blanc réactif contenant du tampon acéto-acétique.

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

**- Représentez graphiquement sur papier millimétré la DO à 540 nm en fonction de la quantité de sucres réducteurs en micromoles dans chaque tube.**

Tube	1	2	3	4	5	6
Sacharrose hydrolysé 5 mM (ml)	0	0.375	0.375	0.375	0.375	0.5
H <sub>2</sub> O D (ml) Tampon	0.5	0.125	0.125	0.125	0.125	0
DNS (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubation 100 °C	5 min					
Refroidissement 4 °C	4 min					
H <sub>2</sub> O D (ml)	5	5	5	5	5	5
Absorbance 540 nm	0					
Sucres réducteurs en µmoles						

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

- 1- Préparez une dilution 1/150 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
Saccharose hydrolysé 0.1 M (ml)	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375	0.375
Extrait enzymatique 1/150	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125
Incubation à 25 °C (min)	0	2	4	6	8	10
DNS (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Incubation 100 °C	5 min					
Refroidissement 4 °C	4 min					
H <sub>2</sub> O D (ml)	5	5	5	5	5	5
Absorbance 540 nm	0					
Sucres réducteurs en µmoles						

**- Pour le temps 0 (Tube 7, blanc réactif), mettre dans l'ordre : 0.5 ml réactif DNS, 0.375 µL solution de saccharose puis 0.125 µL d'extrait enzymatique**

- Après 2 minutes de réaction, retirer le tube 8, y ajouter 0.5 ml de DNS et agiter au vortex pour bien arrêter la réaction. Déposer le tube sur la paillasse.
- Après 4, 6, 8 et 10 minutes, ajouter 0.5 ml de DNS dans 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 540 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 (vi) en µmoles de sucres réducteurs libérés par minute, pour la concentration de saccharose égale à 0,3 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.**