**TP2 : Immobilisation de l’invertase**

**en billes d'alginate.**

**L'invertase**

La β-Fructosidase ou "invertase" ou β-D-FructofuranosideFructohydrolase (E.C. 3.2.1.26) catalyse lareaction :

R-β-D-Fructofuranoside + H2O → R-OH + β-D-Fructose

**L'alginate**

L'alginate est extrait d'algues brunes; ce sel de l'acide alginique est un polymère de 2 acides

hexuroniques : l'acide β-D mannuronnique et l'acide α-L-guluronique, lies par des liaisons 1-4-

glycosidiques (100 à 1000 unites).

**Remarque**

L’alginate est aussi utilisé comme additif alimentaire (E401), notamment dans les boissons ; il améliore leur texture en éliminant les protéines indésirables et est utilisé comme émulsifiant et gélifiant.

**But du TP**

Le but du TP est l’immobilisation de l’invertase en billes d’alginate.

**Matériels et réactifs**

* Levure de boulangerie
* 2 g alginate
* 5 g CaCl2
* Bicarbonate de sodium (17g)
* 4 Becher de 25 ml
* 4 Becher de 100 ml
* 2 Fiole jaugée de 100 ml
* 1 fiole jaugée de 1l
* Eprouvette de 50 ml
* Canne en verre
* Spatule
* Verre de montre
* Entonnoir
* 4 boite de pétri en verre
* Tube à centrifuge
* Bain marie
* Balance
* Centrifugeuse
* Eau distillée
* Papier filtre

**Mode opératoire**

**Préparation de la solution d’alginate à 1 % (m/v) à partir de poudre d’alginate**

* Chauffer environ 75 ml d’eau distillée dans un bécher. A ébullition débutante, arrêter le chauffage.
* Verser en pluie dans l’eau chaude, par petite fraction, 1 g d’alginate tout en agitant avec un agitateur (canne de verre) pendant 5 minutes pour éviter les grumeaux.
* Après dissolution, ajuster le volume à environ 100 ml avec de l’eau distillée.

**Préparation de la solution enzymatique (invertase)**

* Suspendre 10g de levure de boulangerie dans 40ml de bicarbonate de sodium à 0,1M(8,4g de bicarbonate de sodium dans 1 litre d’eau distillée) ;
* Incuber à 35-40°C pendant 24 heures ;
* Centrifuger à 5000 tour/min pendant 5minutes ;
* Récupérer le surnageant (contenant les molécules solubles entre autres l’invertase) ;
* Conserver le surnageant au froid (pour les manipulations ultérieures)

**Préparation du mélange solution d’alginate + l’invertase**

* Incuber pendant 2 minutes dans la glace la solution d’alginate préparée.
* Dans un tube à centrifuger préalablement étiqueter, introduire :
* 2 ml de solution d’alginate à 1 % (m/v) et 500 µl de la solution enzymatique.
* Vortexer
* Conserver dans la glace.

**Fabrication des billes d’alginate incluant l’invertase**

Les billes d'alginate sont formées en faisant tomber des gouttes de mélange (alginate/solution enzymatique) dans une solution de chlorure de calcium.

* Verser les 25 ml de solution de CaCl2 à 0.5 % (0.5 g /100 ml) dans une boite de pétri en verre.
* Aspirer la totalité du mélange alginate – enzyme dans une pipette compte- gouttes souple, sans aspirer l’air.
* Laisser tomber les billes, goutte à goutte, dans la solution de CaCl2.
* Une fois les billes devenues opaques, les récupérer en plaçant une gaze disposée sur le haut d’un becherde 50 ml.
* Eliminer la solution de CaCl2dans l’évier.
* Rincer les billes trois fois avec 50 ml d’eau distillée, puis les laisser sécher sur un papier filtre légèrement humidifier dans une boite de pétri, maintenue dans la glace.