

T.P. n°1 : Extraction de l'invertase et réalisation d'une courbe d'étalonnage pour la méthode à DNS

Introduction :

L'invertase, appelée aussi saccharase ou encore β -fructofuranosidase (EC 3.2.1.23) est une enzyme capable d'hydrolyser la liaison β -fructofuranosique du saccharose en libérant ses constituants : glucose et fructose.

Des levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces carlbergensis*) possèdent une saccharase qui leur permet d'utiliser le saccharose à l'égal des oses comme substrat nutritif. Cette enzyme est intracellulaire. Son extraction nécessite obligatoirement la rupture de la membrane cellulaire. Elle se trouve dans la fraction soluble de la levure.

Réactif au DNS :

En milieu alcalin et chaud, l'acide 3,5-dinitrosalicylique (3,5-DNS) jaune est réduit par les oses réducteurs en acide 3-amino 5-nitrosalicylique rouge orangé. Il faut noter que les courbes d'étalonnage ne passent pas toujours par l'origine.

Ainsi, l'activité enzymatique de l'invertase est étudiée en dosant les sucres réducteurs libérés après hydrolyse par la méthode à DNS.

Matériel :

- ✓ Tubes à essai ;
- ✓ Pipettes et micropipette ;
- ✓ Eprouvette ;
- ✓ Bêchers ;
- ✓ Tubes pour la centrifugation ;
- ✓ Flacons pour la congélation ;
- ✓ Balance ;
- ✓ Étuve ;
- ✓ Centrifugeuse ;
- ✓ Bain-marie ;
- ✓ Agitateur vortex ;
- ✓ Spectrophotomètres et cuves.

Réactifs :

- ✓ Levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) ;
- ✓ Solution de bicarbonate de sodium à 0,1 M ;
- ✓ Tampon acétate de sodium pH 4,7 ;
- ✓ Réactif au DNS ;
- ✓ Solution de saccharose à 0,1 M (sucre de table);

- ✓ Solution de glucose et fructose à 0,005 M ;

Préparations :

- Saccharose à 0,1mol/l : 34,2g de sucre de table dans un litre d'eau distillée.
- Solution de glucose et fructose à 0,005 M : 1g glucose + 1g fructose dans un litre d'eau distillée.
- Bicarbonate de sodium à 0,1M : 8,4g de bicarbonate de sodium dans 1 litre d'eau distillée.
- Tampon acétate de sodium à 0,05M pH 4,7 : 4,1g acétate de sodium dans 1 litre d'eau distillée + acide acétique dilué (5%).

Mode opératoire :

- ✓ Suspendre 10g de levure de boulangerie dans 40ml de bicarbonate de sodium à 0,1M ;
- ✓ 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) ;
- ✓ Jeter le culot formé de débris cellulaires ;
- ✓ Noter le volume total de surnageant (éprouvette) ;
- ✓ Conserver le surnageant au froid (pour les manipulations ultérieures).

Préparation de la gamme étalon :

- ✓ Réaliser une gamme d'étalonnage suivant le tableau ci-dessous :

N° de tube	0	1	2	3	4	5
Solution de glucose + fructose 0,005M (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Tampon acétate pH 4,7 (ml)	1					
Solution de saccharose 0,1 M (ml)	1					
Réactif au DNS (ml)	2					
Incubation	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Homogénéiser, boucher les tubes avec du papier aluminium et porter 5 min au bain marie bouillant. ✓ Laisser refroidir puis ajouter : 					
Eau distillée (ml)	6					

- ✓ Homogénéiser et laisser reposer 10 min à température ambiante.
- ✓ Lire les absorbances (DO) à 540 nm contre le blanc (tube 0).

Travail à faire :

Tracer la courbe d'étalonnage : $DO = f([\text{sucre inverti}] \text{ en } \mu\text{M})$.