

TP n°2

Production, extraction et étude de l'activité de l'amylase d'une souche microbienne

1. Introduction

L'amylase est une enzyme clé dans le processus de dégradation des polysaccharides, capable d'hydrolyser les liaisons α -1,4-glycosidiques de l'amidon, libérant ainsi des molécules plus simples telles que le maltose et le glucose. Cette enzyme est produite par diverses sources microbiennes, notamment des bactéries du genre *Bacillus*. Ces bactéries sont bien connues pour leur capacité à synthétiser des amylases extracellulaires, facilitant ainsi la conversion de l'amidon en sucres fermentescibles dans divers processus industriels. Contrairement à certaines autres enzymes intracellulaires, l'amylase bactérienne est généralement sécrétée dans le milieu environnant, ce qui permet une extraction plus aisée sans nécessité de rupture cellulaire.

2. But du travail

Produire, extraire et évaluer l'activité de l'amylase à partir d'une souche microbienne *Bacillus* tout en se familiarisant avec les techniques de culture, extraction enzymatique et quantification de l'activité de l'amylase.

3. Matériel et réactifs

- Bouillon de culture (Amidon (1%), Peptone (0,5%), Extrait de levure (1,5%)).
- Tampon (adapté au pH 7).
- Eau distillée stérile.
- Extrait enzymatique brut (des souches de *Bacillus*).
- Maxilase (5000 UI).
- Tubes à essai stériles.
- Centrifugeuse.
- Spectrophotomètre (réglé à 540 nm).
- Tubes pour précipitation.
- Pipettes graduées.

4. Procédure

Production et extraction de l'amylase sur milieu liquide

1. Préparation des pré-cultures:

- Préparer un milieu bouillon contenant 1% d'amidon, 0,5% de peptone et 1,5% d'extrait de levure.
- Ajuster le pH du milieu à 7.
- Stériliser le milieu en autoclave à 121°C pendant 15-20 minutes.

2. Inoculation:

- Inoculer les souches productrices d'amylase dans le milieu stérile préparé.
- Incuber les cultures à 30°C pendant 24 heures sous agitation.

3. Centrifugation des cultures:

- Après incubation, centrifuger les cultures à 5000g pendant 15 minutes à température ambiante.
- Séparer le surnageant (qui contient l'amylase produite) des cellules.

4. Filtration:

- Filtrer le surnageant à travers un filtre stérile dans des tubes stériles, en maintenant des conditions aseptiques.
- Conserver les filtrats stériles pour les tests.

Étude de l'activité de l'amylase

1. Préparation du mélange réactionnel pour évaluer l'activité amyliques:

- Préparer quatre mélanges réactionnels comme indiqué dans ci-dessous :
 - **Blanc** : 3 mL de tampon seulement.
 - **Contrôle négatif** : 2 mL de tampon et 1 mL d'amidon.
 - **Contrôle positif** : 1 mL de tampon, 1 mL d'amidon, et 1 mL de Maxilase (5000 UI).
 - **Échantillon** : 1 mL de tampon, 1 mL d'amidon, et 1 mL d'extrait brut (contenant l'amylase).
- Total de volume pour chaque mélange : 3 mL.

2. Incubation de la réaction:

- Incuber les mélanges réactionnels à 37°C pendant 10 minutes.
- Suivre la réaction pour observer la formation de produit (glucose).

3. Évaluation de l'activité amylasique:

- Après incubation, mesurer la densité optique à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.
- Calculer la concentration de glucose produit en se basant sur une courbe d'étalonnage préalablement établie, reliant l'absorbance (540 nm) à la concentration de glucose (g/L).

Observation

- Pas de réaction, pas de variation d'absorbance à 540 nm.
- Pas de dégradation de l'amidon, absorbance proche de zéro.
- Dégradation complète de l'amidon, forte absorbance indiquant la production de glucose.
- Dégradation de l'amidon si l'amylase est active, absorbance variable selon la concentration enzymatique.

Précautions

- Utiliser des réactifs frais et stériles (solution d'amidon, solution iodée, etc.) pour garantir la précision des résultats.
- Bien équilibrer les tubes dans la centrifugeuse pour éviter tout déséquilibre pouvant endommager l'appareil ou influencer les résultats.
- Mesurer avec précision les volumes des réactifs et des extraits enzymatiques pour garantir la reproductibilité des résultats.
- Nettoyer les cuvettes du spectrophotomètre avant chaque lecture pour éviter les erreurs de mesure d'absorbance.

5. Compte rendu du travail

Interprétez les résultats obtenus lors de la mise en TP et répondez aux questions suivantes:

- Comment la température d'incubation influence-t-elle la production d'amylase ? Y a-t-il une température optimale ?
- Quel est l'effet du pH du milieu sur l'activité enzymatique ?
- Comment différents types d'amidon (maïs, pomme de terre, etc.) influencent-ils la production et les propriétés de l'amylase ?
- L'amylase est-elle spécifique à l'amidon ou peut-elle hydrolyser d'autres substrats (dextrines, oligosaccharides) ?
- Comment la production d'amylase est-elle régulée chez *Bacillus* ? Quels sont les signaux qui induisent la synthèse de l'enzyme ?
- Comment l'amylase produite par votre souche se compare-t-elle à d'autres amylases commerciales ?

