

T.P. n°1 : immobilisation de l'invertase dans les fibres d'agar

Principe :

L'extrait brut obtenu à partir des cellules de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*), contenant de l'invertase, est immobilisé par rétention physique : il s'agit d'une inclusion dans des fibres de gel d'agar.

Matériel :

- ✓ Erlen + bécher ;
- ✓ Tubes à essai ;
- ✓ Pipettes et micropipette ;
- ✓ Eprouvette ;
- ✓ Seringue de 5ml ;
- ✓ Support ;
- ✓ Plaque chauffante ;
- ✓ Balance de précision, spatule et verre de montre ;
- ✓ Agitateur ;
- ✓ Etuve réglée à 40 °C ;
- ✓ Bain-marie bouillant(95°C) ;
- ✓ Agitateur vortex.
- ✓ Filtre ou passoir ;
- ✓ Spectrophotomètre et cuves.

Réactifs :

- ✓ Extrait de levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*) ;
- ✓ Tampon acétate de sodium pH 4,7 ;
- ✓ Agar ;
- ✓ Réactif de DNS ;
- ✓ Saccharose à 0,1 M ;
- ✓ Sel de chlorure de sodium à 5M ;

Mode opératoire :

1. Préparation d'une solution de saccharose à 0,1M :

Dissoudre 3,42 g de saccharose dans 100 ml d'eau distillée.

2. Préparation d'une solution de chlorure de sodium à 5M :

Dissoudre 29,22 g de NaCl dans 100 ml d'eau distillée.

3. Préparation d'un gel d'agar à 1,5 % :

- ✓ Dissoudre 1,5 g d'une poudre d'agar dans 100 ml d'eau distillée.
- ✓ Porter à ébullition 2 à 3 minutes.
- ✓ Laisser refroidir la solution jusqu'à 60°C.

4. Immobilisation de l'extrait de levure dans le gel d'agar :

- ✓ Dans une seringue tiédie, mettre en contact 2,5 ml de la solution d'agar et 0,5 ml de l'extrait de levure à une température de 60°C;
- ✓ Faire tomber des gouttes de ce mélange dans 100 ml de la solution de NaCl à température de 0°C à 20°C (pour cela, mettre le bécher contenant la solution du sel dans la glace). Ceci aboutit à la formation des fibres contenant l'extrait de levure ;
- ✓ Laisser reposer les fibres 30 minutes dans la solution de NaCl ;
- ✓ Filtrer les fibres, les rincer à l'eau distillée et les égoutter ;

5. Mise en évidence de l'activité enzymatique de l'invertase immobilisée :

Préparer les tubes suivants :

| | Tube 0 | Tube 1 | Tube 2 | Tube 3 | Tube 4 |
|----------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Tampon acétate pH 4,7 | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml | 2,5 ml |
| Solution saccharose 0,1 M | 0 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml | 1 ml |
| Temps de réaction | 0 | 3 min | 6 min | 10 min | 15 min |

- ✓ Après agitation, mettre les tubes dans l'étuve 5 minutes à 40°C ;
- ✓ Introduire les fibres d'agar dans les tubes (même quantité) ;
- ✓ Remettre les tubes dans l'étuve à 40°C pendant 3, 6, 10 et 15 minutes ;
- ✓ Arrêter la réaction en filtrant le contenu des tubes dans d'autres tubes ;
- ✓ Ajouter 2ml du réactif de DNS ;
- ✓ Bien agiter et chauffer au bain-marie bouillant pendant 5 minutes ;
- ✓ Laisser refroidir puis ajouter 6ml d'eau distillée,
- ✓ Homogénéiser et laisser reposer 10 minutes à température ambiante ;
- ✓ Lire les absorbances (DO) à 540nm contre le blanc (tube 0).

Travail à faire :

- ✓ Tracer la courbe $DO = f(t)$
- ✓ Tracer la courbe $[\text{sucres invertis}] = f(t)$ en utilisant la courbe d'étalonnage ;
- ✓ Calculer la vitesse initiale de la réaction (V_i) en mmol de saccharose hydrolysé. $L^{-1}.min^{-1}$ (L = litre de milieu réactionnel)).
- ✓ Interpréter les résultats obtenus.