

TP Extraction d'enzymes à partir de certains tissus

Les enzymes sont des macromolécules qui catalysent des réactions biochimiques spécifiques. Du fait de leur nature protéique, les enzymes sont codées par des gènes portés par les génomes des différents organismes. La grande majorité des enzymes sont fragiles et peu résistantes dans les conditions d'usage industriel, d'où l'intérêt de rechercher des enzymes de substitution plus robustes dans des conditions bien définies en température, pH et pression.

Pour cela différentes sources d'enzymes sont exploitées en biotechnologie à savoir, les cellules végétales, animales ou microbiennes

L'extraction est une opération qui consiste à séparer certains composés d'un organisme (animal, végétal ou microbien) selon diverses techniques (physique ou chimique).

Objectif du TP :

- Extraction d'enzymes : invertase à partir de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* ; *alpha amylase* à partir de blé et polyphenol oxydase à partir de (pomme, datte ou banane)
- Mise en évidence l'activité des enzymes dans l'extrait cellulaire

Réactifs et matériels utilisés

Acétate de sodium ; Acide citrique ; Eau distillée ; Empois d'amidon ; phosphate de sodium ; Saccharose ; Levure ; Lugol ; Liqueur de Fehling (LF) ; pyrocatéchol ; Mortier ; Agitateur ; Ph mètre ; Centrifugeuse ; Bac à glace ; Bain marie.

Protocole expérimentale

Préparation de l'échantillon et Broyage :

- **Invertase**

Broyer dans un mortier pendant 5 min, 30 g de levure et de 60 ml d'eau distillée et ajouter 6ml de tampon citrate 0,1M (pH 6). Couvrir et agiter jusqu'à la dissolution de la levure.

- **Amylase**

Broyer 20 caryopses d'orge (ou blé dur) germés dans 25 ml de tampon phosphate pH 5,2, laisser reposer 5 min (en agitant si possible). Filtrer et compléter le filtrat à 50 ml avec le tampon.

- **Polyphénol oxydase**

Broyer une masse de pomme dans 100ml d'une solution de tampon phosphate de sodium (0,1M, pH 6,8). Agiter puis filtrer le broyat.

Composition du tampon et réactifs utilisés

Tampon citrate pH=6 : pour 1L de solution

- ✓ Acétate de sodium (24,096g)
- ✓ Acide citrique (3,471g)

Tampon phosphate pH 5,2

- sodium hydrogénophosphate (ou disodium hydrogénophosphate dodecahydré ou sodium

TP Extraction d'enzymes à partir de certains tissus

phosphate dibasique ou sodium phosphate disodique : $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (9,46 g)

- Potassium phosphate monopotassique (ou potassium dihydrogénophosphate ou potassium phosphate monobasique : KH_2PO_4) (9,06 g)

Tampon phosphate de sodium pH 6,8 dans 1L de solution

Empois d'amidon à 1%

La solution de pyrocatechol à 0.1M, est préparée dans un tampon phosphate (0,1M, pH 6,8)

Centrifugation

Récupérer un volume du broyat (10ml), Centrifuger à 4000 tr/min pendant 15 minutes.

Révélation de l'enzyme

Invertase

Incuber au bain marie 30 °C pendant 5 min un volume (5ml) de l'extrait enzymatique avec 10 ml de saccharose après ajout 5ml de Liqueur de Fehling.

Amylase

Incuber au bain marie 40 °C pendant 5 min un volume (5ml) de l'extrait enzymatique avec 5 ml de d'empois d'amidon après ajout 5ml de Liqueur de Fehling ou (Iugol).

Polyphénol oxydase

Incuber au bain marie 30 °C pendant 5 min un volume (5ml) de l'extrait enzymatique avec 5 ml de pyrocatechol

Questions

- A votre avis quel est le but du tampon utilisé et du bac à glace dans cette expérience.
- Pourquoi centrifuger ?
- Qu'avez-vous observé après l'ajout à l'extrait enzymatique du saccharose (d'empois d'amidon ou pyrocatechol) ? justifier votre réponse.