

Département de Biologie Physico-Chimique
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Université A. Mira de Bejaia



Bejaia, 2024/2025

Matière : **Enzymologie approfondie**, 3^{ème} année Licence de Biochimie

Matière : **Enzymologie appliquée**, 3^{ème} année Licence de Toxicologie

TP 3 d'enzymologie
MESURE DE L'ACTIVITE DE L'INVERTASE DE LEVURE

Le saccharose un sucre non réducteur dextrogyre ($[\alpha]_D^{20} = +66,5^\circ$) est hydrolysé par l'invertase ou β -fructofuranosidase, pour donner un mélange équimolaire de glucose et de fructose, tous deux réducteurs ayant pouvoir rotatoire global lévogyre ($[\alpha]_D^{20} = -20^\circ$).

But du TP : Déterminer l'activité de l'invertase extraite du *Saccharomyces cerevisiae* par le dosage du glucose produit par méthode volumétrique de diiode (méthode d'iodométrie)

Principe de la méthode : L'activité de l'invertase est déterminée par la mesure de la quantité du glucose formé au cours de la réaction d'hydrolyse enzymatique du saccharose par la méthode volumétrique de diiode. Cette méthode indirecte repose sur une réaction d'oxydation-réduction entre l'aldose et l'iode (I_2). Elle est basée sur la capacité des aldoses à réduire l'iode en iodure (I^-) en milieu alcalin, permettant ainsi de déterminer la quantité d'aldéhyde présente dans l'échantillon.

Réactifs

Solution d'invertase de levure

Solution de saccharose : 1%

Solution de diiode 0,025 M

NaOH 2,5M

Acide sulfurique 3M

Thiosulfate de sodium 0,05N

Empois d'amidon 0,5%

Protocole

1. Extraction de l'invertase

- ✚ Suspendre 30g de levure de boulangerie dans 100 ml de bicarbonate de sodium à 0,1M.
- ✚ Incuber à 40°C pendant 2H.
- ✚ Centrifuger à 3000 tr/min pendant 10 min.
- ✚ Récupérer le surnageant contenant l'invertase.
- ✚ Conserver l'extrait invertase à 4°C jusqu'à utilisation

2. Hydrolyse de saccharose par l'invertase

✚ Préparer 5 Tubes de la façon suivante :

	Tube 0 (S0)	Tube 1 (S1)	Tube 2 (S2)	Tube 3 (S3)	Tube 4 (S4)
Saccharose 1%	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml
Tampon acétate	5ml	4.9ml	4ml	2,5ml	0ml
Solution invertase diluée	0ml	0.1ml	1ml	2,5ml	5ml

✚ Boucher les tubes et Incuber à température ambiante pendant 10min

✚ Porter les tubes pendant 5 min au bain marie à 100°C

✚ Refroidir les tubes et Procéder au dosage du glucose formé

3. Dosage du glucose produit

✚ Préparer 5 Erlen de la façon suivante :

	Erlen 0	Erlen 1	Erlen 2	Erlen 3	Erlen 4
Solution de dosage	5ml S0	5ml S1	5ml S2	5ml S3	5ml S4
H2O	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml
Diode 0,025 M	15ml	15ml	15ml	15ml	15ml
NaOH 2,5 M	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml

✚ Agiter et placer à l'obscurité les erlens 30 min

✚ Ajouter dans chaque Erlen 2 ml d'H₂SO₄ (3 M)

✚ Agiter et observer la régénération du diode.

✚ Procéder au dosage de l'iode régénéré par titration avec une solution de thiosulfate à 0,05 M placée dans la burette.

✚ Verser goutte à goutte jusqu'à avoir une couleur jaune clair, ajouter quelques gouttes d'empois d'amidon ; continuer à verser la solution de thiosulfate jusqu'à obtention du virage (solution incolore).

✚ Noter les volumes obtenus V0, V1, V2, V3, V4 et V5

Expression des résultats

✚ Déterminer les concentrations en glucose formé par hydrolyse enzymatique du saccharose

✚ Détermination de l'activité de l'invertase extraite en U/ml d'extrait