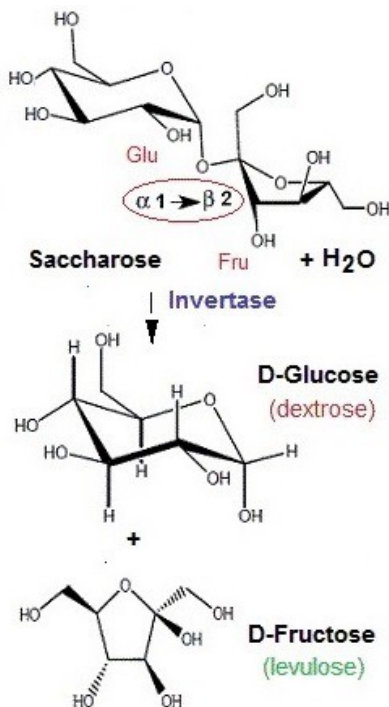


## Travaux Pratiques

# EXTRACTION ET ETUDE CINÉTIQUE DE L'INVERTASE



## Sommaire

- 1) [Etude cinétique des enzymes \(Théorie de Michaelis-Menten\)](#)
- 2) [Invertase. Généralités](#)

### [2.1. Nature de l'enzyme et substrats utilisés](#)

## 2.2. Tests d'activité enzymatique

## 2.3. Domaines d'application possibles de l'invertase

### 3) Partie expérimentale. Extraction et Etude cinétique de l'invertase

#### 3.1. Extraction de l'invertase et préparation de la solution

enzymatique pour les tests cinétiques.

#### 3.2. Préparation de la gamme étalon pour le dosage des sucres réducteurs

#### 3.3. Etude de la cinétique d'hydrolyse du saccharose en fonction du temps

#### 3.4. Etude de l'influence de la concentration en substrat (saccharose) sur la vitesse de la réaction et détermination des paramètres cinétiques $K_m$ et $V_{max}$

### 3) Compte-rendu

### 4) Contrôles continus et Contrôle final

### 5) Liens utiles

## 1) Etude de la cinétique des enzymes (Théorie de Michaelis-Menten)

Les enzymes michaeliennes catalysent la transformation du substrat (S) selon des réactions qui suivent la théorie de Michaelis-Menten et qui se déroulent en deux étapes avec un passage par un complexe intermédiaire :

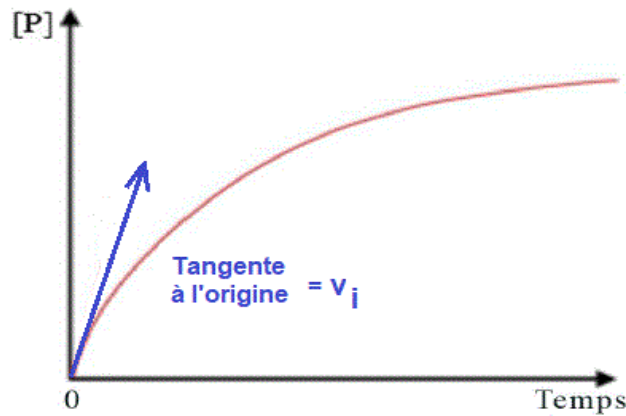


Pour étudier expérimentalement les propriétés cinétiques de ces enzymes, on doit toujours utiliser une concentration en substrat en excès par rapport à la concentration en enzyme, ceci pour être en conformité avec l'une des hypothèses simplificatrices de la théorie de Michaelis-Menten.

L'étude cinétique peut se faire en suivant la variation de la concentration de substrat en fonction du temps ou encore la variation de la concentration du produit formé (P) en fonction du temps.

$$V = \frac{d[S]}{dt} = -\frac{d[P]}{dt}$$

On peut aussi quand cela est possible suivre la variation de la concentration en fonction du temps de l'une des formes du coenzyme (voir détails dans le cours).



Dans le cas où l'on dispose d'une technique qui permet de suivre l'augmentation de la concentration du produit formé en fonction du temps, on commence par tracer la courbe  $[P] = f(t)$  pour différentes concentrations de substrat  $[S]$ .

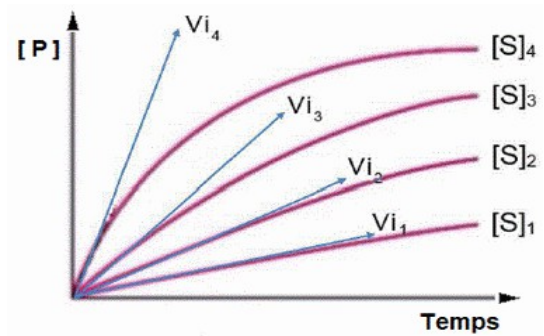
Pour chaque concentration de S fixé, on obtient une courbe  $[P] = f(\text{temps})$  avec deux parties distinctes :

- Une **partie linéaire** : uniquement dans les premiers instants de la réaction. Dans cette phase 'période de vitesse initiale', la réaction se comporte comme une réaction d'ordre zéro, la variation de la concentration de S étant négligeable par rapport à la concentration initiale  $[S]_0$  inférieure à 10 %.
- Une partie non linéaire qui suit l'équation de la vitesse des réactions d'ordre 1, observée quand la quantité de S transformé devient importante (supérieur à 10 %).
- Dans la première phase linéaire de cette courbe, la vitesse  $V = d[P]/dt$  est constante et correspond à la **vitesse initiale**  $V_0$  de la réaction. Pour déterminer  $V_0$  avec précision il faut le faire sur la tangente à l'origine de la courbe  $[P] = f(\text{temps})$ .

Pour une concentration en enzyme donnée  $[E]_0$ , la vitesse initiale de la réaction dépend de la concentration en substrat  $[S]$ .

Elle augmente avec l'augmentation de  $[S]$ , jusqu'à atteindre une valeur maximale constante appelée  $V_{\text{max}}$ . De plus, plus  $[S]$  est grande, plus la partie linéaire de la courbe (vitesse constante) est courte.

La vitesse de réaction, exprimée en  $\mu\text{g}$  de P par min ou en  $\mu\text{mole}/\text{min}$ , permet de déduire l'activité enzymatique exprimée en unités internationales (U.I).



L'unité d'activité enzymatique la plus utilisée pour quantifier les vitesses de réactions enzymatiques est l'unité internationale (U.I). **1 U.I. correspond à la transformation de 1 micromole de substrat par minute** à 25°C et dans les conditions optimales de l'activité enzymatique (pH, force ionique).

Une fois la vitesse initiale est déterminée avec précision pour différentes concentrations initiales de substrat, on peut tracer ensuite la courbe expérimentale  $V_o = f([S]_o)$  qui devrait suivre l'allure de la courbe de l'équation de Michaelis-Menten si toutes les hypothèses simplificatrices ont été respectées.

$$V = \frac{K_{+2} [E]_o}{1 + K_m / [S]_o} \quad \text{avec } k_{+2} : \text{ constante catalytique}$$

$K_{+2} [E]_o = V_{\text{max}}$ , vitesse maximale de la réaction qui correspond à l'asymptote horizontale de la courbe  $V_o = f([S]_o)$ .  $K_m$  = constante de Michaelis, elle correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse initiale de la réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale.

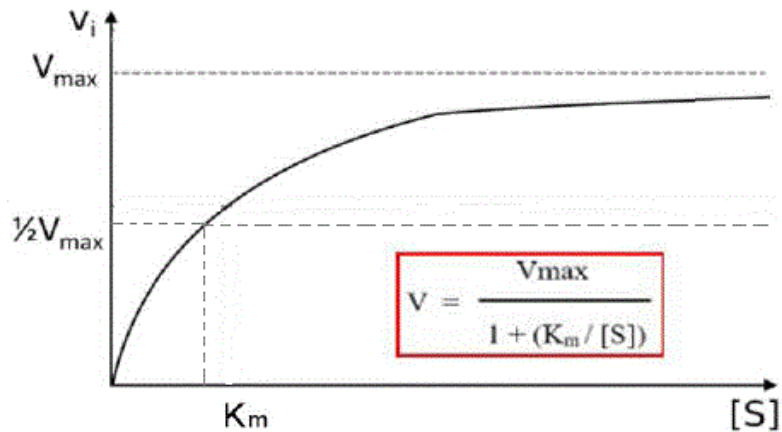
$$K_m = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Dans le cas des réactions simples à un seul complexe intermédiaire [ES], la première étape étant la plus rapide ; la constante de Michaelis  $K_m$  peut être assimilée à la constante de dissociation du complexe ES.

$$K_m = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_D$$

(Pour plus de détails voir cours d'enzymologie).

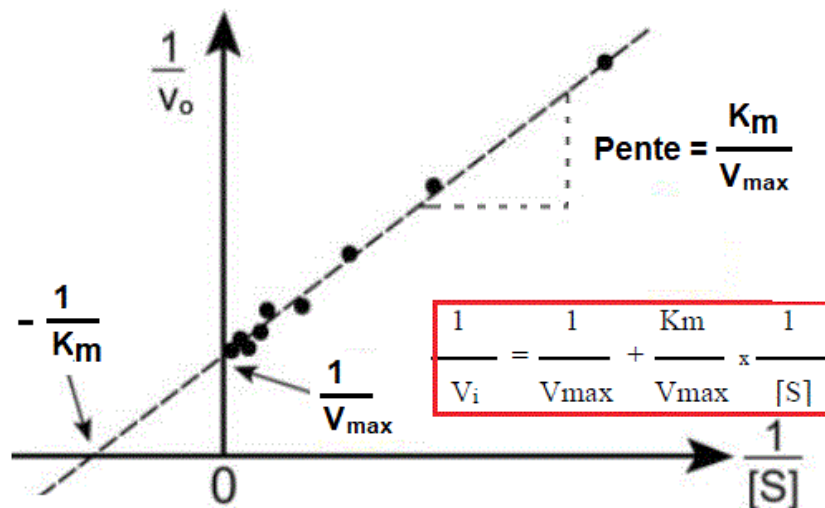
Par conséquent, **K<sub>m</sub> permet de quantifier la force de liaison entre l'enzyme et le substrat** ou encore l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Plus le K<sub>m</sub> est faible plus l'affinité est forte et *vice versa*.



Pour déterminer les constantes cinétiques avec plus de précision, il est préférable d'utiliser la représentation dite « des doubles inverses » représentation de Lineweaver-Burk. D'autres courbes peuvent être tracées dont celles de Eadie-Hofstee et Hanes-Woolf (voir figure ci-dessous).

$1 / V_i = f(1 / [S])$  qui est une droite d'équation :

$1/v = [K_m/V_{\max}] \times 1/[S] + 1/V_{\max}$ , de forme  $y = ax + b$



## 2) Invertase. Généralités

### 2.1. Nature de l'enzyme et substrats utilisés

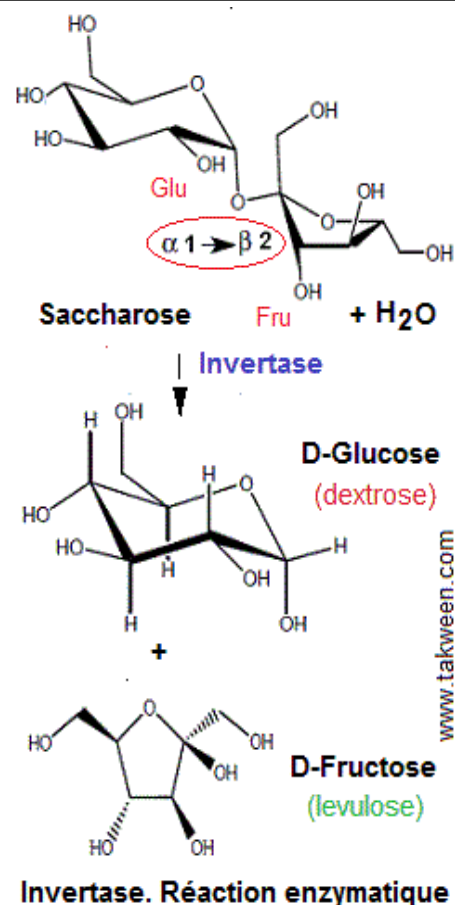
L'invertase ou  $\beta$ -D-fructosidase ou encore  $\beta$ -D-Fructofuranoside Fructohydrolase (EC : 3.2.1.26) est une enzyme présente dans la levure de boulangerie en quantité assez importante. Elle est présente sous deux formes :

- une invertase externe (située dans la paroi). C'est la forme prédominante. Sa masse molaire est de l'ordre de 270 000 g.mol<sup>-1</sup> constituée de 50 % de protéine et de 50 % de mannane. La partie glucidique n'est pas indispensable à l'activité catalytique, mais elle augmente la stabilité.
- une invertase interne (vacuole). Elle représente un faible pourcentage de l'invertase totale. Elle a les mêmes caractéristiques cinétiques que l'invertase externe. Sa masse molaire est de l'ordre de 135 000 g.mol<sup>-1</sup> (il n'y a pas de partie glucidique)

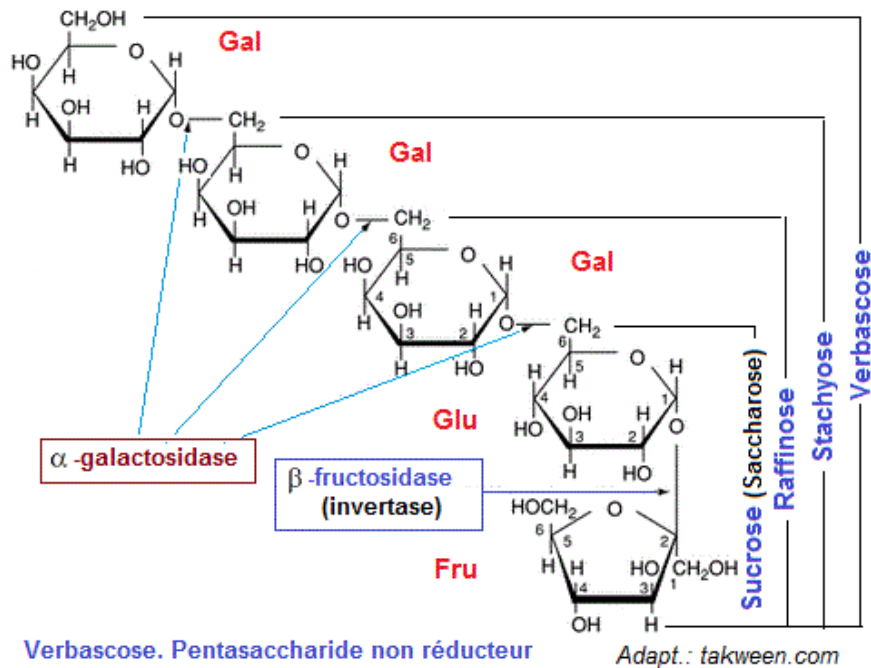
Globalement, l'invertase est une enzyme de nature glycoprotéique de haut poids moléculaire, constituée de plusieurs sous-unités. Cette enzyme a été retrouvée dans des plantes (ex: la betterave à sucre) et dans des micro-organismes (ex: levures). Elle est également présente dans l'intestin où elle fait partie des enzymes membranaires qui interviennent dans le métabolisme des glucides. Elle existe sous plusieurs formes (formes acides, formes neutres) elle est inhibée aux pH alcalins.

**L'invertase** ou  **$\beta$ -D-Fructofuranosidase** est une **hydrolase** qui agit sur des glucides comme substrat.

Le **saccharose** (dissaccharide non réducteur) qui est le ( $\alpha$ -D-glucopyranosyl 1 – 2  $\beta$ -D-Fructofuranoside) reste le substrat idéal de l'invertase. En l'hydrolysant l'enzyme produit un mélange équimolaire de glucose ( $\alpha$ -D-Glucopyranose) et Fructose ( $\beta$ -D-Fructofuranose), à goût très sucré, appelé **sucre inverti**, car, il en résulte une inversion du pouvoir rotatoire de la solution d'où le nom d'invertase. La solution de saccharose étant dextrogyre alors que le mélange (Glucose + Fructose) est lévogyre.



Néanmoins, étant une bêta-fructofuranosidase, cette enzyme reconnaît d'autres substrats (bêta-fructofuranosides) comme le raffinose et le stachyose (voir figure ci-dessous)

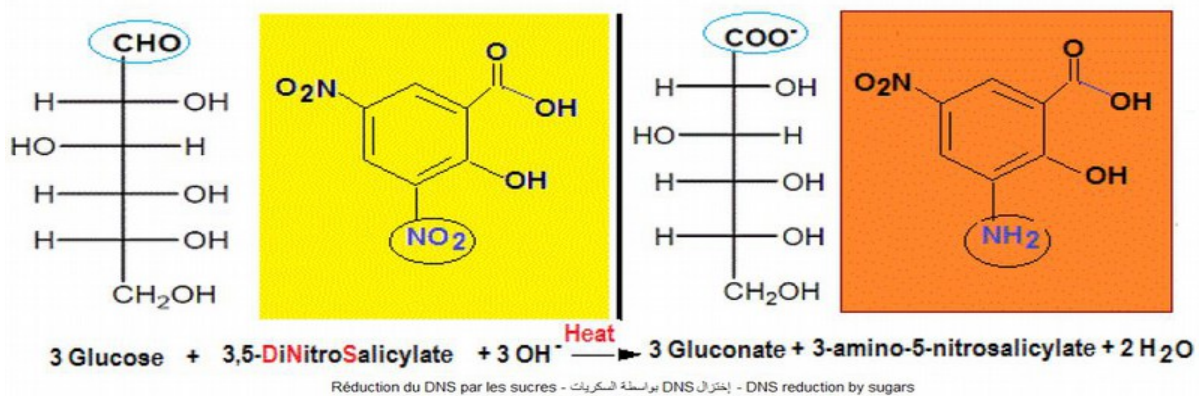


L'affinité de l'invertase pour les autres Fructofuranosides, peut être estimée par détermination des paramètres cinétiques, en particulier la **constante de Michaelis (Km)**. L'**efficacité catalytique** sur tel ou tel substrat peut être évaluée par le rapport des paramètres représentant la vitesse maximale (Vmax) sur la valeur de Km, préalablement calculées pour chaque substrat..

## 2.2. Tests d'activité enzymatique de l'invertase

La mesure de l'activité d'hydrolyse du saccharose par l'invertase peut-être effectuée par plusieurs méthodes utilisant différentes techniques, exemples :

- la polarimétrie: en suivant la variation du pouvoir rotatoire de la solution à l'aide d'un polarimètre.
- le dosage des sucres réducteurs libérés par la réaction à travers la réduction du DNS (3, 5-dinitrosalicylate) suivie par spectrophotométrie.





### 2.3. Domaines d'applications possibles de l'invertase

- L'invertase peut être utilisée pour la production de Fructose et l'obtention de **sirops**. Contrairement aux sirops obtenus par hydrolyse acide de sucres comme le saccharose, les sirops obtenus par l'invertase, sont meilleurs, car n'entraînant pas de formation d'hydroxyfurfural et produits bruns. Le fructose est apprécié par rapport au saccharose, car il ne cristallise pas facilement et possède un goût plus sucré (application dans la pâtisserie).
- L'invertase peut être utilisée dans la production de Mélibiose (Gal alpha(1-6) Glu) à partir du Raffinose (Gal-Glu-Fru) ou de l'inuline (Fructanes).
- L'invertase peut être utilisée pour diminuer le taux de sucres (saccharose) dans les jus.

## 3) PARTIE EXPERIMENTALE. EXTRACTION ET ETUDE CINETIQUE DE L'INVERTASE DE LA LEVURE BOULANGERE

### 3.1. Extraction de l'invertase à partir de la levure boulangère

Les protocoles d'extraction de l'invertase diffèrent selon la source d'enzyme.

#### Matériels et produits :

- 
- |   |                       |
|---|-----------------------|
| • levure de boulanger   | • centrifugeuse       |
| • sable fin   | • Tubes à centrifuger |
| • mortier   | • Tubes à essai       |
| • citrate de Na 10 mM pH 6 ( $\beta$ -mercapto-éthanol 10 mM) | • pipettes            |
| • triton 10%  | • éprouvette          |
|   | • becher              |
-



### Mode opératoire :

- Broyer très finement pendant 5 min au mortier **15 g** de levure de boulanger avec 20 g de sable très fin et **10 ml** de tampon citrate de Na 10 mM **pH 6,0** contenant du  $\beta$ -mercapto-éthanol 10 mM. Ajouter ensuite **15 ml** du même tampon citrate et 0,5 ml de toluène/éthanol et 0,5 ml de triton X100.

- Transvaser le contenu du mortier dans un tube à centrifuger, boucher le tube et agiter vigoureusement au vortex pour permettre au Triton X100 de solubiliser les lipides membranaires et libérer l'invertase.

- Centrifuger **15 min** à 3000 t/min. Recueillir le **surnageant** légèrement ambré, le surnageant est versé lentement dans une éprouvette graduée de 50 ml. C'est l'extrait brut d'invertase (**extrait F**). Il est à diluer **25 fois** avec de l'eau distillée dans une fiole jaugée de 25 ml (**Extrait F dilué**). Ce dernier extrait sera utilisé dans les études cinétiques de ce T. P.

---

## Extraction de l'invertase de la levure boulangère (*Saccharomyces cerevisiae*) (baker's yeast, خميرة المخبز)

---

- Levure de boulangerie (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Sable stérile (N°2)
- Centrifugeuse
- Mortier et pilon (N°1)
- Tampon citrate de sodium 10 mM (pH 6,0) contenant du beta-mercaptoéthanol 10 mM (N°3)
- Triton X-100 (détergent non ionique) (N°4)
- Tubes à centrifuger (N°5)



### 3.2. Préparation de la gamme étalon pour le dosage des sucres réducteurs

L'hydrolyse du saccharose (sucre non réducteur) libère deux sucres réducteurs (le Glucose et le Fructose). En incubant la solution de saccharose avec le DNS, les deux sucres réducteurs produits, vont le réduire. On obtient le DNS réduit qui absorbe la lumière à 540 nm. Cette absorbance est donc proportionnelle à la quantité de glucose et fructose libérée et par conséquent proportionnelle à la quantité de saccharose hydrolysé.



## Mode opératoire

Une solution étalon de saccharose hydrolysé à 20 mM (solution équimolaire de Glucose 10 mM + Fructose 10 mM) est utilisée pour servir de référence dans le dosage des sucres réducteurs. La réalisation de cette gamme étalon est faite selon le tableau suivant.

Le tube 1 (sans sucre réducteurs) joue le rôle de témoin. Les tubes sont complétés à 3 ml avec de l'eau distillée.

### Préparation de la gamme étalon de sucres réducteurs

Tubes	1	2	3	4	5
Saccharose hydrolysé 10 mM (ml)	0	0,1	0,3	0,5	1
Eau distillée (ml)	3	2,9	2,7	2,5	2
<b>DNS (ml)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Incubation à 100°C	5 minutes				
Refroidissement à + 4°C	4 minutes				
Eau distillée (ml)	10	10	10	10	10
Absorbance à <b>540</b> nm	0	.....	.....	.....	.....



- Calculer la quantité de sucres réducteurs en micromoles dans chaque tube
- Représenter graphiquement sur papier millimétré la DO à 540 nm en fonction de la quantité de sucres réducteurs en micromoles dans chaque tube.

***La droite étalon obtenue servira pour déterminer la quantité de saccharose hydrolysé par l'invertase dans toute réaction enzymatique suivante.***

### 3.3. Etude de la cinétique d'hydrolyse du saccharose en fonction du temps

#### Mode opératoire

L'expérience tendant à étudier la cinétique d'hydrolyse du saccharose par l'invertase de levure est réalisée selon le tableau suivant. On utilise 6 tubes numérotés 6 à 11.

#### Cinétique d'hydrolyse du saccharose en fonction du temps par l'invertase de l'extrait brut F

Tubes	6	7	8	9	10	11
Saccharose 0,3 M (ml)	1	1	1	1	1	1
Tampon acétate 0,1 M pH 4,7 (ml)	1	1	1	1	1	1
Invertase (extrait F au 1/25) (ml) <i>(Ne rajouter l'enzyme qu'une fois les tubes sont à 30°C)</i>	1	1	1	1	1	1
Temps d'incubation à 30°C (min)	0	2	4	6	8	10
DNS (ml)	1	1	1	1	1	1
Incubation à 100°C	5 minutes					
Refroidissement à + 4°C	4 minutes					
Eau distillée (ml)	10	10	10	10	10	10
Absorbance à 540 nm	0	....	....	....	....	....
Sucres réducteurs (µmoles)	0	....	....	....	....	....

- Au début ajouter 1 ml de DNS uniquement dans le tube 6 (témoin de la réaction). Par son pH très basique, la solution de DNS joue le rôle d'inhibiteur de la réaction enzymatique. La réaction ne peut démarrer dans le tube 6, contenant le DNS dès le départ.
- Au temps 0 min, ajouter rapidement dans les tubes 6 à 11, 1 ml de l'extrait enzymatique F dilué et agiter.
- Incuber au bain-marie à 30°C, les tubes 7 à 11 (garder le tube témoin sur la paillasse).
- Après 2 minutes de réaction, retirer le tube 7, y ajouter 1 ml de DNS et agiter au vortex pour bien arrêter la réaction. Déposer le tube sur la paillasse. Après 4, 6, 8 et 10 minutes, ajouter 1 ml de DNS dans les tubes 8, 9, 10 et 11, respectivement, puis agiter.
- A la fin de l'expérience, mettre tous les tubes à 100°C pendant 5 minutes, refroidir et ajouter dans chaque tube 10 ml d'eau distillée.

- Après avoir régler le zéro de DO du spectrophotomètre avec la solution du tube 6 (témoin), mesurer les DO à 540 nm des autres tubes (7 à 11).

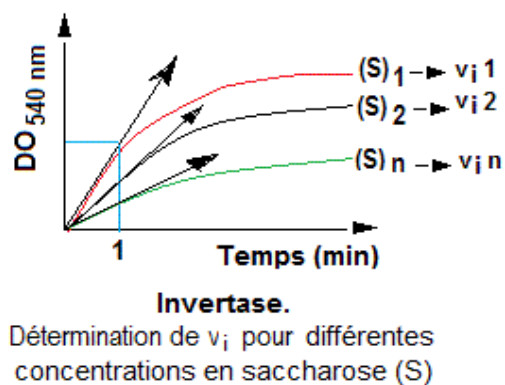
### Détermination de la vitesse initiale de la réaction

- Rapporter les DO obtenues aux différents temps de réaction sur la droite de la gamme étalon des sucres réducteurs pour obtenir la quantité de sucres réducteurs (en  $\mu\text{moles}$ ) aux différents temps de réaction.
- Tracer la courbe représentant la quantité de sucres réducteurs (en  $\mu\text{moles}$ ) en fonction du temps de réaction.
- Déterminer à partir de cette courbe la **vitesse initiale ( $v_i$ )** en  $\mu\text{moles}$  de sucres réducteurs libérés par minute, pour la concentration de saccharose égale à 0,3 M.
- Calculer la vitesse initiale en  $\mu\text{moles}$  de saccharose hydrolysé par minute (UI) trouvée pour la concentration de saccharose égale à 0,3 M.
- Déterminer le nombre d'UI contenu dans 1 ml d'extrait F non dilué.

### 3.4. Etude de l'influence de la concentration en substrat (saccharose) sur la vitesse de la réaction et détermination des paramètres cinétiques $K_m$ et $V_{max}$

Cette expérience exige l'utilisation de 5 concentrations de saccharose (30 mM, 60 mM, 120 mM, 200 mM et 300 mM). De chaque concentration, résultera une vitesse initiale ( $v_{i_n}$ ). L'objectif étant de tracer la courbe :

$$v_i = f([S])$$



Faute de temps, pour cette expérience on ne pourra pas suivre la cinétique minute par minute pour déterminer la vitesse initiale pour chaque concentration de saccharose et qui aurait donné des cinétiques ressemblant à celles de la courbe ci contre. Dans cette étude, on se limitera à un seul temps d'incubation de 5 minutes. La quantité de saccharose hydrolysé sera donc divisée par 5 pour trouver la vitesse initiale en  $\mu\text{moles}$  de saccharose hydrolysé par minute (UI).

- Pour faire l'expérience  $v_i = f([S])$  et déterminer les paramètres  $K_m$  et  $V_{max}$ , on doit d'abord préparer les concentrations de saccharose dont on aura besoin.

**Seul un volume de 1 ml de chaque concentration sera utilisé dans la réaction.**

Par exemple, on peut préparer 6 ml de chaque concentration de saccharose à partir de la concentration mère 300 mM, déjà disponible.

L'expérience de l'effet de la concentration du substrat sur la vitesse de la réaction est faite selon le tableau suivant. Elle nécessite 7 tubes (N° 12 – 17).

	30 mM	60mM	120 mM	200 mM
<b>Saccharose 300 mM pour 6 ml (ml)</b>	?	?	?	?
<b>Eau distillée (ml)</b>	?	?	?	?
<b>Volume total (ml)</b>	6	6	6	6



1 ml :

1 ml :	30	60	120	200		
<b>Tubes</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>
<b>Saccharose x mM (ml)</b>	1 <small>(de H<sub>2</sub>O)</small>	1 <small>de 30 mM</small>	1 <small>de 60 mM</small>	1 <small>de 120 mM</small>	1 <small>de 200 mM</small>	1 <small>de 300 mM</small>
<b>Tampon acétate 0,1 M pH 4,7 (ml)</b>	1	1	1	1	1	1
<b>Invertase (extrait F au 1/25) (ml)</b> <b>(Ne rajouter l'enzyme qu'une fois les tubes sont à 30°C)</b>	1	1	1	1	1	1
<b>Incubation à 30°C</b>	<b>5 minutes</b>					
<b>DNS (ml)</b>	1	1	1	1	1	1
<b>Incubation à 100°C</b>	<b>5 minutes</b>					
<b>Refroidissement à + 4°C</b>	<b>4 minutes</b>					
<b>Eau distillée (ml)</b>	10	10	10	10	10	10
<b>Absorbance à 540 nm</b>	0					
<b>Sucres réducteurs (µmoles)</b>	0					
<b>Vitesse initiale (vi) en µmoles saccharose hydrolysé/min (UI)</b>	0					

- Répartir 1 ml de chacune des concentrations de substrat préalablement préparées dans 6 tubes correspondants. Dans le tube 12, on met 1 ml d'eau distillée à la place du saccharose (témoin).
- Ajouter dans chaque tube 1 ml de tampon acétate (pH 4,7).
- Placer des tubes au bain marie à 30°C et démarrer la réaction en y ajoutant 1 ml d'extrait enzymatique F dilué dans chaque tube, en essayant de minimiser le temps de décalage entre les tubes. Aller dans l'ordre du tube 12 au tube 17.
- Incuber 5 minutes à 30°C.

- Arrêter la réaction en ajoutant 1 ml de DNS dans tous les tubes. Garder le même ordre.
- Traiter tous les tubes comme avant pour le dosage des sucres réducteurs (voir tableau).
- Lire la DO de tous les tubes à 540 nm.
- A l'aide de la gamme étalon des sucres réducteurs, trouver la quantité de sucres réducteurs dans chaque tube en  $\mu\text{moles}$ .
- Sachant que cette quantité résulte de l'hydrolyse pendant 5 minutes, déterminer la vi en  $\mu\text{moles de S/min}$  pour chaque concentration de substrat.
- Tracer la courbe des vitesses initiales en  $\mu\text{moles/min}$  en fonction de la **concentration finale en saccharose (en mM) dans le milieu réactionnel**.
- A l'aide la représentation de Lineweaver-Burk ( $1/v_i = f(1/[S])$ ), Déterminer les valeurs précises des paramètre Km et Vmax pour le substrat (ici saccharose). Interpréter

#### **Remarque :**

Pour les concentrations élevées de saccharose, on peut avoir une inhibition par les substrats. Cette inhibition est surtout causée par l'augmentation de la viscosité du milieu réactionnel (mobilisation de l'eau).

## COMPTE RENDU

Voir lien sur la plateforme pour le dépôt des rapports.

## LIENS UTILES

- Vidéo Lien spectrophotométrie : <https://youtu.be/xwSKw5er66A>
- Vidéo extraction de l'invertase :  
[https://www.youtube.com/watch?v=MTIoXRG\\_YI0](https://www.youtube.com/watch?v=MTIoXRG_YI0)
- Vidéo interprétation TP :  
<https://www.youtube.com/watch?v=baUXdJYpmlo&t=302s>

Contact : [baaziz@uca.ac.ma](mailto:baaziz@uca.ac.ma)

Cadi Ayyad University, Marrakech, Morocco