



S4. Module: Enzymologie et Métabolisme

Travaux Pratiques (TP)

Enseignement à distance

TP Enzymologie : EXTRACTION et ETUDE CINETIQUE DE L'INVERTASE de LA LEVURE BOULANGERE Fichier guide (à télécharger sur PC ou Mobile)

IMPORTANT:

- Les TP à distance exigent plus d'attention. Pour mieux les comprendre lisez d'abord votre cours. Des évaluations à distance (quiz, rapport) faits par les étudiants, sont **bonifiées** pour chaque étudiant.
- Pour tirer profit de vos documents, en particulier les fichiers pdf, il faut les **TELECHARGER** d'abord sur votre PC ou mobile pour les lire offline. Ceci **rendra cliquables les liens web** du fichier et permet d'économiser sur les frais de connexion à internet.
- Suivre l'**ordre pédagogique** des actions mentionnées dans ce fichier guide.

1/ Rendez vous sur votre polycopié de TP enzymologie. Si vous ne l'avez pas encore téléchargé, faites le sur la plateforme de l'Université ou télécharger à partir du lien :

<https://www.takween.com/techniques/enzymologie-TP-invertase-polycopie.pdf>

Lisez bien le protocole expérimental et le but des 3 expériences du TP (Gamme étalon des sucres réducteurs, Cinétique de l'invertase et détermination de v_i pour le saccharose 0,3 M et Effet de la concentration en substrat menant vers la détermination de K_m et V_{max} pour le saccharose)

2/ Télécharger la présentation du TP à partir de la plateforme
Lisez la présentation pour comprendre mieux les 3 expériences du TP


3/ Ecoutez la vidéo du TP : https://youtu.be/MTloXRG_Y10 .

Cette vidéo permet de mémoriser les principaux gestes dans le travail pratique


4/ Album photos du TP :

- Extraction







Levain Souche 1




Levain Souche 2




2 3 7 8



2 3 4 5 6



6 5 4



7 8 9

1: Levure boulangère

2: Tampon Phosphate (pH 7,5)

3: Tampon Citrate (pH 6,0)

4: Culot

5: Surmigeant

6: Centrifugeuse

7: NaCl (1M)

8: Triton X100

1: Levure boulangère

2: Tampon phosphate (pH 7,2)

3: Tampon Citrate (pH 6,0)

4: NaCl 0,1 M

6: SDS 0,1 M

8: Surmigeant

5: Triton-X-100

7: Centrifugeuse

9: Culot

Paramètres cinétiques (unités arbitraires)

		Souche 1	Souche 2
Saccharose	Vmax:	12	8,1
	Km:	4	2,7
	Vmax/Km:	3	3
Raffinose	Vmax:	8	8
	Km:	2	4
	Vmax/Km:	4	2

www.takween.com

- Réalisation de la gamme étalon des sucres réducteurs



Dosage des sucres réducteurs par DNS قياس السكريات المختزلة بـ www.takween.com

Calcul des quantités de sucres réducteurs

Exemple de calcul pour 0,1 mL de saccharose hydrolysé 10 mM

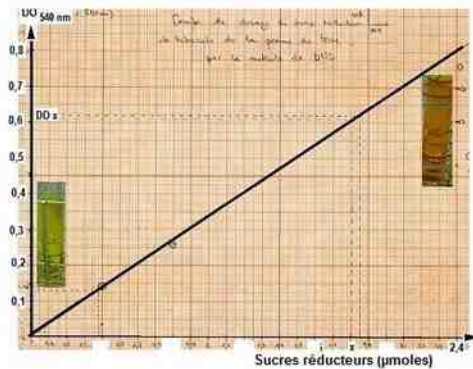
Saccharose hydrolysé 10 mM = 10 mmoles/Litre
= 10000 µmoles/L

10000 µmoles dans 1000 mL
X ? µmoles dans 0,1 mL

X = _____ = 1 µmole saccharose hydrolysé
= _____ µmoles de sucres réducteurs

gamme étalon de sucres réducteurs

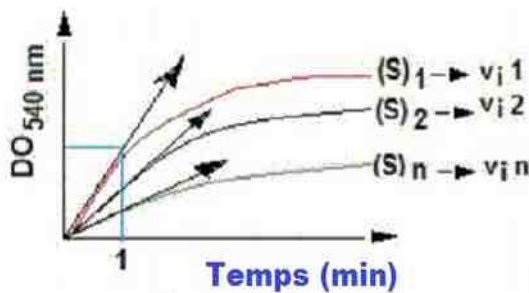
Tubes	1	2	3	4	5
Saccharose hydrolysé 10 mM (ml) (= 20 mM de sucres réducteurs)	0	0,1	0,3	0,5	1
Eau distillée (ml)	3	2,9	2,7	2,5	2
DNS (ml)	1	1	1	1	1
Incubation à 100°C	5 minutes				
Refroidissement à + 4°C	4 minutes				
Eau distillée (ml)	10	10	10	10	10
Absorbance à 540 nm	0



- Etude de la cinétique d'hydrolyse du saccharose

INVERTASE DE LEVURE.

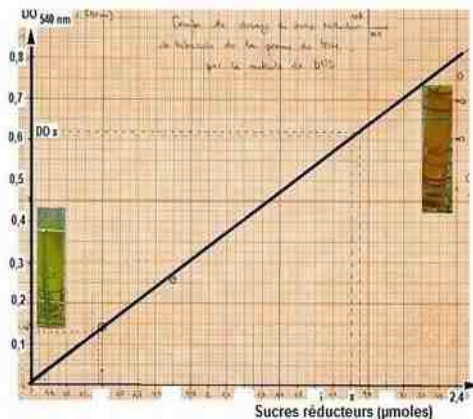
CINETIQUE D'HYDROLYSE DU SACCHAROSE 300 mM



Substrat (S):
v_i 300 mM =

Invertase. Cinétique d'hydrolyse du saccharose 300 mM

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) (Ne rajouter l'enzyme qu'une fois les tubes sont à 30°C)	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

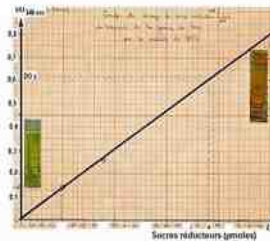
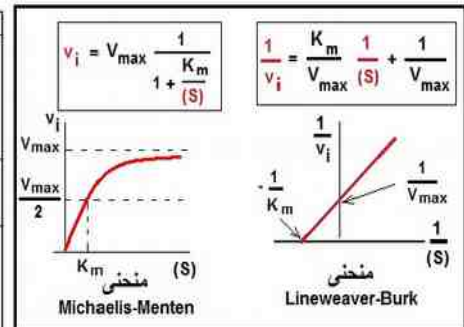


- Détermination des paramètres Km et Vmax de l'invertase pour le saccharose

INVERTASE DE LEVURE.

Détermination de Km et Vmax à partir de concentrations différentes en saccharose

Tubes	12	13	14	15	16	17
Saccharose x mM (mL) →	1 (de H2O)	1 (de 30 mM)	1 (de 60 mM)	1 (de 120 mM)	1 (de 200 mM)	1 (de 300 mM)
Tampon acétate 0,1 M pH 4,7 (mL)	1	1	1	1	1	1
Invertase (extrait F au 1/25) (mL) <small>(Ne rajouter l'enzyme qu'une fois les tubes sont à 30°C)</small>	1	1	1	1	1	1
Incubation à 30°C	5 minutes					
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
DO 540 nm →	0	?	?	?	?	?



5/ Interprétations des résultats

A l'aide de cette vidéo d'interprétation du TP (lien ci dessous), essayer de répondre aux différentes questions posées dans le compte rendu du TP :

<https://youtu.be/baUXdJYpmlo>

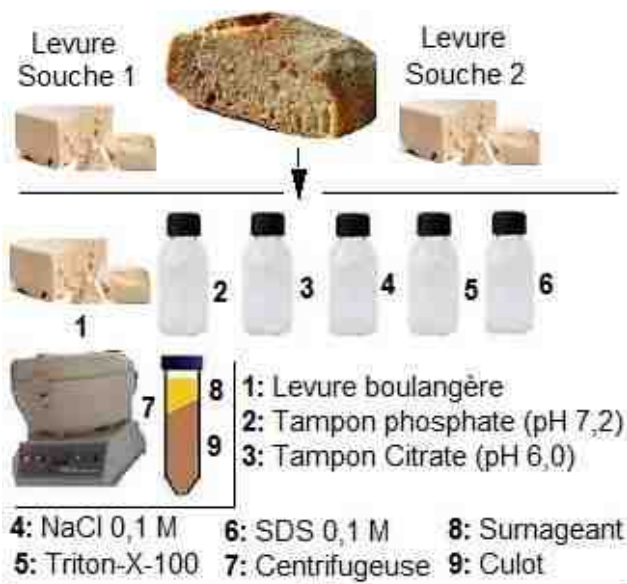
6/ En gardant le **polycopié comme référence officielle du TP**, vous pouvez **consulter des compléments d'information sur l'invertase** en visitant les pages (facultatif):

- <https://www.takween.com/techniques/invertase-enzymologie.html>
- <https://www.takween.com/techniques/invertase-enzymologie-travail-pratique.html>
- <https://www.takween.com/techniques/invertase-effet-substrat-inhibiteurs.html>

7/ Faire votre évaluation sous forme de quelques quiz formatifs

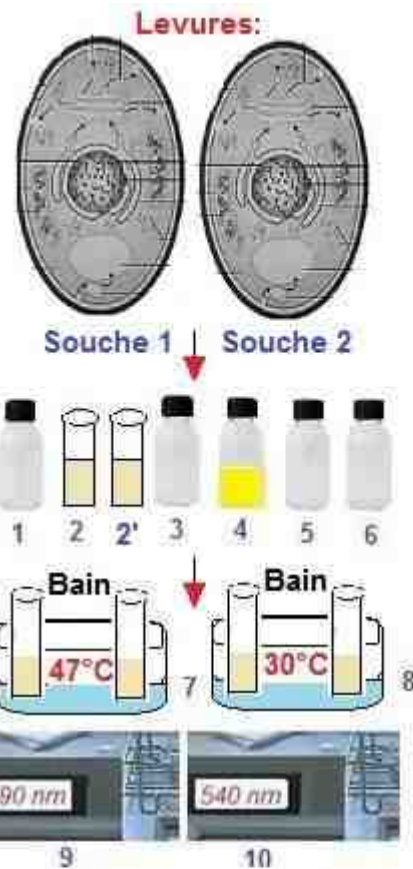
- **Quiz blanc du TP** enzymologie sur la plateforme
- Quiz sur takween.com :
- <https://www.takween.com/qcm-invertase.html>
- <https://www.takween.com/QCM/invertase-enzyme-qcm.html>

8/ Penser aux contrôles continus

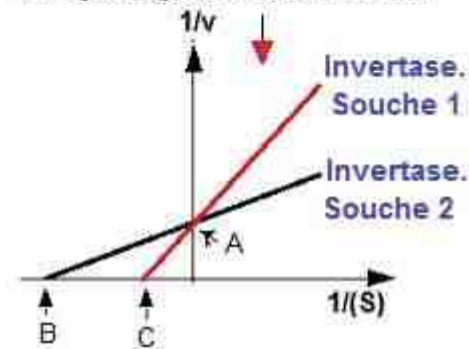


Paramètres cinétiques (unités arbitraires)

		Souche 1	Souche 2
Saccharose	Vmax:	12	8,1
	Km:	4	2,7
	Vmax/Km:	3	3
Raffinose	Vmax:	8	8
	Km:	2	4
	Vmax/Km:	4	2



- 1: Tampon citrate (pH 4,5) 4: DNS
- 2, 2' : Enzyme (extrait) 5: EDTA
- 3: Tampon acétate (pH 6,4) 6: Saccharose
- 7: Bain marie à 47°C 8: Bain marie à 30°C
- 9: Spectrophotometre à 690 nm
- 10: Spectrophotometre à 540 nm



Contact : baaziz@uca.ac.ma

Cadi Ayyad University, Faculty of Sciences ; Marrakech, Morocco