**TP d’ Enzymologie (2020-2021)**

**TP n °1: La spécificité des enzymes digestives**

Nous consommons différents glucides, tels que l'amidon, le glycogène ou le saccharose. Ces différentes macromolécules subissent au cours de la digestion une ou plusieurs actions enzymatiques permettant de produire des monosaccharides, comme le glucose ou le fructose. Ces molécules de petite taille peuvent alors être absorbées au niveau de l'intestin et donc parvenir dans la circulation sanguine. Parmi les enzymes impliquées dans la digestion des glucides, nous connaissons l'amylase et l’invertase qui peuvent catalyser l’hydrolyse de l’amidon et du saccharose, en des molécules plus simples.

***Matériel et réactif à utiliser :***

* tubes à essais
* pipettes
* bain-marie 37° + thermomètre
* liqueur de Fehling
* lugol
* levure de boulanger
* salive
* sacharrose
* amidon

***Mode opératoire:***

1. ***Préparation des solutions enzymatiques*:**

Solution d’amylase: 1ml de la salive + 2 ml de l’eau

Solution d’invertase: 1g de la levure + 20ml d’eau distillée

1. ***Préparation des solutions glucidiques*:**

Saccharose (solution de 2%): 2g du saccharose + 100 ml d’eau distillée

Amidon (solution de 1%): 1g d’amidon+ 100ml d’eau distillée.

1. ***Préparer 4 tubes a essai:***

**Tube 1:** 2 ml saccharose + 0.5ml invertase

**Tube 2:** 2 ml saccharose + 0.5ml amylase

**Tube 3:** 2 ml amidon + 0.5ml invertase

**Tube 4:** 2 ml amidon + 0.5ml amylase

1. Placer les tubes dans un bain-marie pendant 30 min
2. Ajouter quelques gouttes du Lugol aux tubes 3 et 4

* Faites votre observation

Ajouter 0.5 ml de la liqueur de Fehling aux tubes 1 et 2, placer les tubes autre fois dans le bain-marie pendant 10min

* Faites votre observation

**TP n° 02: إنزيم الأميلاز من مصدر نباتي**

يستخلص إنزيم الٲميلاز اعتبارا من الشعير المستنبت في الظلام لمدة لا تقل عن 72 ساعة:

1. **المرحلة الأولي**

* نزن 25 غ من البدور المستنبتة
* اسحقها جيدا مع إضافة 200 مل من الماء المقطر تدريجيا
* نترك الخليط En repos لمدة 15 دقيقة
* نقوم بعدها بعملية الترشيح
* نحتفظ بالراشح و هو الجزء الذي يحوي الإنزيم.

2**- تنقية المحلول الإنزيمي**

\* خد 20 مل المحلول الراشح و أضف له 80 مل من الكحول(99%).

\* اخلط قليلا و اترك المزيج En repos لمدة 15 دقيقة

\* نقوم بعملية الترشيح.

\*نتخلص من الراشح و نضيف 20 مل من الماء علي ورق الترشيح.

المحلول المتحصل عليه يمثل المحلول الإنزيمي.

1. **التأكد من وجود و فعالية الإنزيم**

في أنبوب اختبار نضع:

* 0.6مل من محلول النشاء بتركيز %1.

+ 0.4 مل من المحلول المنظم (PH=4.7 (.

* اخلط جيدا ثم نضع الخليط في الحمام المائي ( °37).
* نضيف بعد دلك 1 مل من المحلول الإنزيمي. و نعيد الخليط إلي الحمام المائي.
* نحضر 05 أنابيب اختبار و نضع في كل أنبوب 0.4 مل من المحلول الأصلي و نضيف في كل مرة قطرة من محلول Lygol.
* يتم العمل وفقا لحركية مع الزمن: 15 0٬3٬6٬9٬12٬ ثانية.

في كل مرة سجل الملاحظات. الزمن اللازم لعمل الانزيم هو 10-15 دقيقية.

1. **دراسة تأثير مادة التفاعل علي النشا ط الإنزيمي**

* نقوم بتحضير عدة تراكيز انطلاقا من محلول النشاء بتركيز %1 حسب الجدول التالي:

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **رقم الأنبوب** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** |
| **النشاء % 1(مل)** | **0.1** | **0.2** | **0.3** | **0.4** | **0.5** | **0.6** | **0.7** | **0.8** | **0.9** | **1** |
| **ماء مقطر (مل)** | **0.9** | **0.8** | **0.7** | **0.6** | **0.5** | **0.4** | **0.3** | **0.2** | **0.1** | **0** |
| **التركيز %** | **0.1** | **0.2** | **0.3** | **0.4** | **0.5** | **0.6** | **0.7** | **0.8** | **0.9** | **1** |

* نضع جميع الأنابيب بالتراكيز المختلفة في الحمام المائي.
* نعيد نفس التجربة في المرحلة 03 مع جميع التراكيز المختلفة.
* سجل الملاحظات وعلق عليها في كل تجربة.

**05- دراسة تأثير درجة الحرارة علي النشاط الإنزيمي**

نقوم بالتجربة حسب الجدول التالي:

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **درجة الحرارة** | **25** | **30** | **35** | **40** | **45** | **50** | **55** |
| **النشاء % 1(مل)** | **06** | **06** | **06** | **06** | **06** | **06** | **06** |
| **المحلول المنظم (مل)** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** | **0.4** |
| **محلول الإنزيم (مل)** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** |
| **رقم الأنبوب** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** | **6** | **7** |

نعيد مراحل التجربة 03 مع جميع الأنابيب و نسجل زمن التحلل في كل تجربة.

علق علي النتيجة.

**ملاحظة :**

* + يحضر محلول Lygol كما يلي: نخلط كمية من اليود (I) تقدر ب 0.177 غ مع 0.250 غ من يود البوتاس (IK) في دورق و يكمل الحجم الي 100 مل بالماء المقطر.
  + المحلول المنظم: نحضر محلولين بحجم 100 مل لكل منهما كل علي حدى و بتركيز يساوي ( 15/1غ) و دلك من المادتين (KH2 PO4) و ( Na Hpo4). المحلول المتحصل عليه دوPH = 4.7).

**TP n°: 03: INVERTASE**

### Nature de l’enzyme et substrats utilisés

L’**invertase** ou β**-D-Fructofuranosidase** est une **hydrolase** qui agit sur des glucides comme substrat. C’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.

Le substrat idéal de l’invertase est le **saccharose**. En hydrolysant ce substrat l’enzyme produit un mélange équimolaire de glucose et Fructose. L’invertase présente une forte affinité pour le saccharose.

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

Le dosage des sucres **réducteurs l**ibérés par la réaction à travers la réduction du DNS (3, 5-dinitrosalicylate) suivie par spectrophotométrie.

### 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 (β-mercapto-éthanol 10 mM) • pipettes
* triton 10% • éprouvette
* becher

**Mode opératoire**:

1. 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 β -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.
2. 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.
3. Centrifuger **15 min** à **3000 t/min**. Recueillir le **surnageant** légèrement ambré, le surnageant est versé lentement dans une éprouvette graduée de **50 ml.**
4. 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**).
5. Ce dernier extrait sera utilisé dans les études cinétiques de ce T. P.



### 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**

1. 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.
2. La réalisation de cette gamme étalon est faite selon l e 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.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tubes** | **1** | **2** | **3** | **4** | **5** |
| **Saccarose hydrolysé 10 mM/ ml** | **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** | **……...** | **……...** | **……...** | **……...** |

1. Calculer la quantité de sucres réducteurs en micromoles dans chaque tube
2. 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.

### 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.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Tubes** | **6** | **7** | **8** | **9** | **10** | **11** |
| **Saccharose 0.3 M (ml)** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** |
| **Tampon acetate 0.1M PH 4.7(ml)** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** |
| **Invertase (extrait F) au 1/25 (ml)** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** |
| **Temps d’incubation à 30°C** | **0** | **2** | **4** | **6** | **8** | **10** |
| **DNS (ml)** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** | **1** |
| **Incubation à 100 °C** | **5 minutes** | | | | | |
| **Refrodissement à +4°C** | **4 minutes** | | | | | |
| **Eau distillée (ml)** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** | **10** |
| **Absorbance à 540 nm** | **0** | **……** | **……** | **……** | **……** | **……** |
| **Sucres reducteurs (micro moles** | **0** | **……** | **……** | **……** | **……** | **……** |

1. 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.
2. Au temps **0 min**, ajouter rapidement dans les tubes **6 à 11, 1 ml** de l’extrait enzymatique **F** dilué et agiter.
3. Incuber au bain-marie à 30°C, les tubes **7 à 11** (garder le tube témoin sur la paillasse).
4. 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.
5. 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.
6. 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**

1. 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 µmoles) aux différents temps de réaction.
2. Tracer la courbe représentant la quantité de sucres réducteurs (en µmoles) en fonction du temps de réaction.
3. Déterminer à partir de cette courbe la **vitesse initiale (vi)** en µmoles de sucres réducteurs libérés par minute, pour la concentration de saccharose égale à 0,3 M.
4. Calculer la vitesse initiale en µmoles de saccharose hydrolysé par minute (UI) trouvée pour la concentration de saccharose égale à 0,3 M.
5. Déterminer le nombre d’UI contenu dans 1 ml d’extrait F non dilué.