

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Abou-Bekr Belkaid -Tlemcen
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie des Sciences
de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie



Mémoire
Pour l'obtention du diplôme de master en biologie
Option : « Microbiologie »

Thème

**Etude des paramètres cinétiques de l'invertase extraite
de *Saccharomyces cerevisiae***

Présenté par : **Melle Benmedjahed Lamia**
Melle Bengrine Khadidja

Soutenu le : **11 juin 2017**, devant le jury composé de :

Mr	SENOUCI BEREKSI M.	Maître assistante A	Président
Mme	KHALDI D.	Maître assistante A	Examinatrice
Mme	LEMERINI W.	Maître de conférences B	Rapporteur

Année Universitaire : 2016 – 2017

Remerciement

Je tiens à remercier tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont aidé pendant mon travail de fin d'études. Certains par leurs conseils et leurs connaissances scientifiques, d'autres par leur soutien et leur présence dans les moments les plus pénibles.

Mes premiers remerciements vont à mon promoteur Mme **SEBAA née LEMERINI.W**, pour avoir accepté de nous encadrer et de nous suivre tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous les membres de jury qui ont accepté de juger ce travail, tous ceux qui nous ont accueilli et aidé tout au long de la réalisation de ce modeste travail. Je leur en sais gré.

La vie au sein d'un laboratoire ne se limite heureusement pas à la pratique de la science. Merci à tous nos collègues du labo pour tous les bons moments passés, également à **Wafaa** et **Yassine** pour leur gentillesse, leur disponibilité et leur compétence, merci du fond du cœur.

Je terminerais en rendant hommage à tous les enseignants du primaire, du secondaire et de l'université qui nous ont donné le goût des études. Leur tâche est ingrate et trop peu souvent reconnue. Je leur dois beaucoup.

Dédicace

Grace à l'aide de Dieu j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

A mes chers parents qu'Allah les garde pour moi sains

A ma grand-mère

A mes sœurs : Nora, Salima, Souad et son mari Samir ainsi que leur enfants Ayman, Roumaïssa et Ritadj

A mes belle-sœur : Samira, Souad, Hayat et Amel

A mon encadreur Mme Sebaa née Lemerini wafaa que j'admire beaucoup

A mon amie Melle Bengrine Khadidja

A mes amis : B.SalahEddine, A. Meriem, K. Abia, B.Yamina, k.Abd el khalek, B.Zaki

A tout la famille Benmedjahed, Boutouba, Beldjouhar et Naire

Aux membres de labo « COSNA »

A toutes les personnes que j'aime.

B.Lamia

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A celle qui m'a ouvert les portails et m'a donné la tendresse et le courage, a celle qui endeuiller pour me rendre heureuse, a celle qui attend chaleureusement ce jour « ma chère mère »

A celui qui a fait des grands efforts pour mon bonheur, à celui qui a rêvé de voir cette journée, a celui qui m'a orienté et m'a appris les secrets de la vie « mon père »

A celle qui m'a aidé par sa prière « ma grand-mère »

A mes chers frères : Abdelwahed, Bilal, Abdelkader

A ma belle-sœur : Hanane

A tous mes oncles, mes tantes

A mon encadreur : Mme Sebaa née Lemerini wafaa qui nous a permis de mener à bien ce travail, et de m'avoir si bien dirigé et conseillé

A mon amie : Mlle Benmedjahed Lamia et sa famille

A tous mes amis : K.Abia, A.Meriem, R.Hanane

A toute la famille Bengrine

A tout ceux qui m'ont aidé de prêt ou de loin.

B.Khadidja

Table de matière

Introduction.....	2
Rappelle théorique.....	4
I. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
I.1. Définition.....	6
I.2. Classification	7
I.3. Reproduction.....	7
I.4. Caractéristique biochimique	10
I.5. Métabolisme de <i>saccharomyce cerevisiae</i>	11
I.5.1. Métabolisme glucidique	11
I.5.2. Métabolisme énergétique	11
I.6. Condition de culture de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
I.7. Utilisation industriel	13
II. Invertase	14
II.1. Généralités.....	15
II.2. Définition	16
II.3. Sources et localisation	17
II.4. Structure	18
II.5. Mode d'action	19
II.6. Facteurs influençant l'activité enzymatique de l'invertase	20
II.6.1. Facteurs physicochimiques	21
II.6.1. Facteurs chimiques.....	23
II.7. Applications de l'invertase	24
Matériel et méthodes	25
I. Principaux réactifs utilisées	26
II. Extraction de l'invertase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
II.1. Protocole d'extraction	27
II.2. Dosage des protéines de la préparation enzymatique	28
II.2.1. Dosage des protéines par la méthode de biuret	28

II.2.1.1. Principe.....	28
II.2.1.2. Préparation de la gamme d'étalonnage	28
II.2.1.3. Détermination de la concentration protéique.....	30
II.2.2. Dosage des protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet ...	31
II.2.2.1. Principe.....	31
II.2.2.2. Mode opératoire.....	32
III. Dosage des sucres réducteur.....	33
IV. Détermination de l'activité enzymatique de l'extraction enzymatique	35
IV.1. Détermination de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase	36
IV.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique de l'invertase.....	37
IV.3. Détermination de l'activité enzymatique spécifique de l'invertase.....	37
V. Détermination de pH optimum et de la température optimale de l'extrait enzymatique	38
V.1. Détermination de pH optimum.....	38
V.2. Détermination de la température optimal.....	39
VI. Détermination des paramètres cinétique de l'invertase dans la préparation enzymatique	40
Résultats et discussion	41
I. Recherche de l'activité de l'invertase dans la préparation enzymatique	42
II. Mesure des activités volumique et spécifique de l'invertase.....	43
III. Détermination du pH optimum de l'invertase.....	44
IV. Détermination de la température optimale de l'invertase	45
V. Détermination des paramètres cinétiques de l'invertase dans les conditions standards.....	48
Conclusion.....	53
Références bibliographique	55
Annexe.....	62
I. Préparation du tampon acéto-acétique	63
II. Composition de réactif de biuret	63
III. Composition de réactif de l'acide 3,5-dinitosalicyclique(DNSA).....	64
Résumé.....	65

Liste des abréviations

% : pourcentages

Asn : Asparagine

Asp : Aspartate

BSA : *Bovin sérum albumine*

B : Bêta

DNSA: Acide 3,5 - dinitrosalicylique

DO : Densité optique

g : gramme

kb : kilobase

KDa : kilodalton

Ln : logarithme népérienne

ml : millilitre

ORF : Open reading frame

T : Température (°C)

t : Temps (seconde, minute ou heure)

Tr : Tour

µm : Micro-mètre

UV : Ultraviolet

V_{in} : Vitesse initiale

V_{max} : Vitesse maximale

Liste des figures

Figure 1 : Micrographie électronique à balayage de <i>Saccharomyces</i>	6
Figure 2 : Mode de reproduction végétative.....	8
Figure 3 : Cycle biologique de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
Figure 4 : Réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase.....	16
Figure 5 : Mécanisme de substitution nucléophile des hydrolytiques.....	20
Figure 6 : Inversion du saccharose par l'invertase.....	23
Figure 7 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret.....	30
Figure 8 : Réaction d'oxydation des sucres réducteurs par l'acide 3,5 Dinitro-salicylique (DNSA).....	33
Figure 9 : Droite d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteur.....	34
Figure 10: Cinétique d'hydrolyse du saccharose en présence et en absence d'extrait enzymatique.....	42
Figure 11 : Effet du pH sur l'activité de l'invertase.....	45
Figure 12 : Effet de la température sur l'activité de l'invertase.....	46
Figure 13 : Graphique d'Arrhenius pour l'activation thermique de l'invertase.....	47
Figure 14 : Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat selon l'équation de Michaelis- Menten.....	49
Figure 15 : Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk de la cinétique de l'invertase.....	50

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
Tableau 3 : Dilutions de la solution mère de l'albumine du sérum bovin (BSA).....	29
Tableau 4 : Dilutions de la solution mère enzymatique (méthode de biuret).....	30
Tableau 5 : Dilutions de la solution mère enzymatique (méthode d'absorptiométrie directe dans l'ultraviolet).....	32
Tableau 6 : Activités volumique et spécifique de l'invertase dans les conditions standards...	43
Tableau 7 : La concentration en protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet et par méthode du biuret de l'extrait enzymatique.....	44
Tableau 8 : Paramètres cinétiques de l'invertase obtenus à partir des différentes équations.	50

Introduction

Au cours des dernières années, l'exploitation des microorganismes, essentiellement les bactéries et les levures ont apporté une contribution significative dans certains domaines industriels, où diverses industries dépendent en grande partie de leurs métabolites, et de l'utilisation des enzymes pour produire de nombreuses substances.

Les levures comme *Saccharomyces cerevisiae*, plus connue sous le nom de « levure de bière », constituent une source importante de biosynthèse protéique très active, représentée par diverses classes d'enzymes utilisées en industrie. Le genre *Saccharomyces* a un rôle important dans le domaine alimentaire où il fait l'objet d'une production de masse pour servir soit de levure de boulangerie soit pour la production d'enzymes.

L'ingénierie de cette levure a permis la production de l'invertase, une enzyme endocellulaire obtenue par lyse cellulaire. En effet, l'intérêt grandissant vers cette enzyme est justifié par de nombreuses applications industrielles (**Bousmaha et al., 2014**). L'invertase est une hydrolase qui catalyse l'hydrolyse du saccharose alimentaire en fructose et en glucose; ce mélange est appelé sucre inverti, d'où le nom de l'enzyme.

Notre thème de recherche consiste à étudier les paramètres cinétiques de l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons procédé comme suit :

- L'extraction de l'invertase de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.
- La détermination de la concentration en protéine de l'extrait enzymatique par deux méthodes de dosages (la méthode de biuret et l'absorptiométrie directe dans l'ultra-violet).
- La détermination de l'activité enzymatique de l'invertase.
- L'étude de l'effet du pH et de la température sur l'activité enzymatique de l'invertase.
- La détermination des paramètres cinétiques de l'invertase.

Rappels Théoriques

Chapitre I.
Saccharomyces cerevisiae

I. *Saccharomyces cerevisiae*

I.1. Définition

Les levures sont des eucaryotes unicellulaires (**Jaime, 2008**), des hétérotrophes, faisant partie du groupe des champignons dont on les distingue par l'absence de vrai mycélium. Elles sont microscopiques et immobiles (**Guiraud et Galzy, 1998**). Parmi eux on trouve l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, dont le nom systématique fait référence au saccharose qui signifie «sucre» et myces qui signifie «champignon», tandis que *cerevisiae* fait référence à «cervoise», qui veut dire bière (**Tortora et al., 2003**). Ce sont des cellules généralement sous forme ovoïdes ou sphériques, parfois cylindriques ou de forme plus spécifiques (**Bourgeois et Larpent, 1996**), avec une taille très variable, de 3 à 10 μm de largeur contre 4 à 14 μm de longueur (**Larpent, 1991**). Elles se présentent isolées, en paires, en chaînes ou en petits amas (**Bourgeois et Larpent, 1996**).



Figure 1 : Micrographie électronique à balayage de *saccharomyces cerevisiae* (5 μm) (**Geoffrey, 1999**).

I.2. Classification

La classification du genre *Saccharomyces* est représentée dans le « tableau 1 » :

Tableau 1 : Classification du genre *Saccharomyces* (Bacha, 2008; Larpent et Gourgaud, 1985).

Règne	<i>Protistes-Eucaryotes</i>
Classe	<i>Ascomycetes</i>
Sous-classe	<i>Hemiascomycetes</i>
Ordre	<i>Endomycetales</i>
Famille	<i>Saccharomycetaceae</i>
Sous-famille	<i>Saccharomycetoideae</i>
Genre	<i>Saccharomyces</i>
Espèce	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

I.3. Reproduction

I.3.1. Reproduction végétative

Le bourgeonnement représente le mode de reproduction végétative le plus courant chez les levures. A l'exception de quelque genre, les bourgeons apparaissent dans les zones situées aux extrémités des grands axes des cellules végétatives lorsque celles-ci ont une forme ovoïde ou allongée. Ce type de bourgeonnement est connu sous le nom de multilatéral et caractérise les *saccharomyces* (Larpent et Gourgaud, 1985).

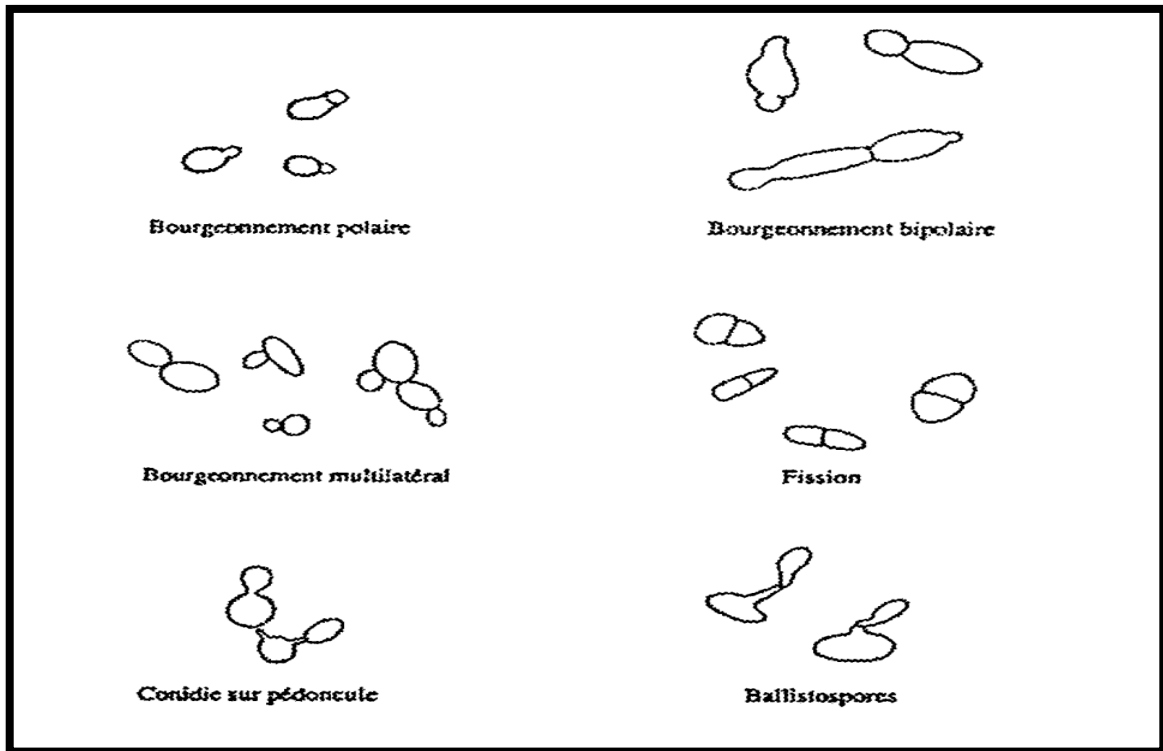


Figure 2 : Mode de reproduction végétative (Bacha, 2008).

I.3.2. Reproduction sexuée

Les ascomycètes, ou champignons à asques, constituent un groupe importante et diversifié de champignons remarquables par leurs structures en forme de sac appelées asque. La fusion des noyaux et la méiose subséquente ont lieu à l'intérieure de l'asque. Les produits de la méiose constituent les ascospores qui seront libérées ultérieurement pour former la prochaine génération gamétophytique (Purves et al., 1994).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la conjugaison se produit en 6 à 8 heures après la mise en présence des deux types sexuels (Larpent, 1991).

Dans sa phase haploïde, la levure a un total de 16 chromosomes. La levure a été le premier organisme eucaryote à être séquencé. Son génome est constitué de 12,068 kb et contient un total de 6,183 cadres de lecture ouverts (ORFs) à partir desquels 5,800 sont prédits correspondre à des gènes codant pour la protéine (Jaime, 2008).

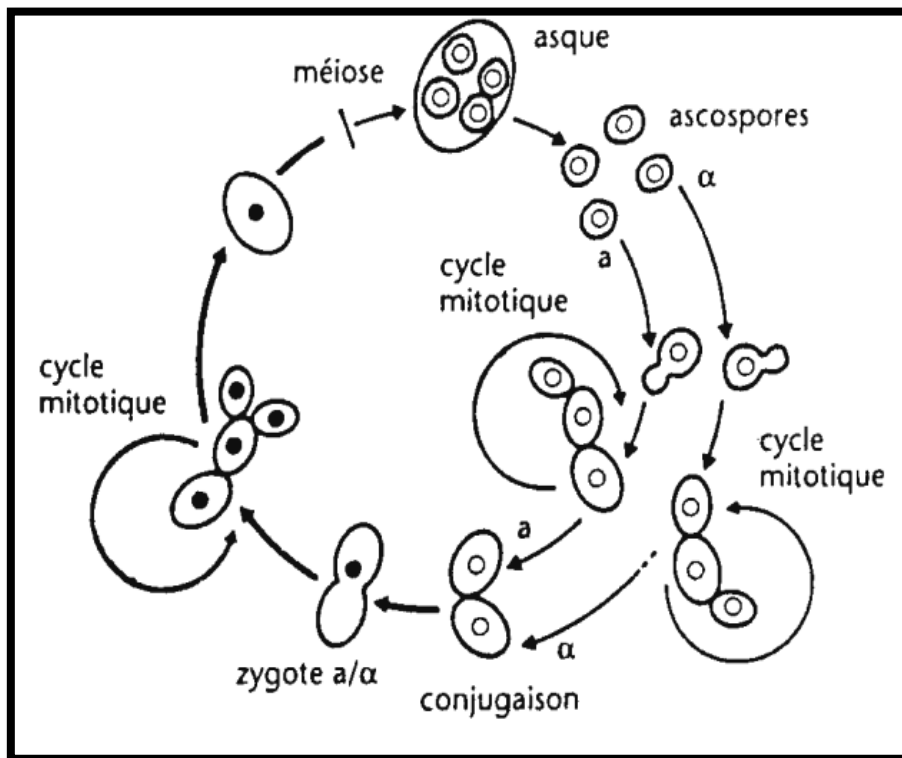


Figure 3 : Cycle biologique de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Bourgeois et Larpent, 1996).

I.4. Caractéristiques biochimiques

Le tableau suivant représente les différentes caractéristiques biochimiques de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Tableau 2 : Caractéristiques biochimiques de *Saccharomyces cerevisiae*
(Guiraud et Galzy, 1998)

Caractéristiques	Utilisation
Nitrate	Négative
Urée	Négative
Fermentation	Positive
Glucose	+F
Galactose	X
Saccharose	+F
Maltose	X
Therhalose	X
Lactose	-
Cellobiose	X
Melibiose	-
Raffinose	+F
Xylose	-
Ethanol	X

(+) ou (-): Utilisation des substrats carbonés.

F: Assimilation.

X: Variable ou non Déterminé.

I.5. Métabolismes du genre *Saccharomyces*

I.5.1. Métabolisme glucidique

Beaucoup d'espèces du genre *Saccharomyces* haploïdes peuvent produire de fortes quantités d'alcool poly-hydrique à partir du glucose. Ces composés sont des produits intermédiaires du cycle des pentoses (**Larpen et Gourgaud, 1985**).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* métabolise le glucose obtenu à partir du milieu en éthanol et en gaz carbonique. Des bulles de gaz carbonique se forment dans la pâte à pain et confère au produit final sa texture allégée. L'éthanol et le dioxyde de carbone sont tous deux retenus dans la bière, mais disparaissent du pain à la cuisson (**Purves et al., 1994**).

I.5.2. Métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique de *Saccharomyces cerevisiae* peut être de type « respiration aérobie » : chaînes respiratoires mitochondriales ou fermentatif (fermentation alcoolique) (**Teixeira et al., 2009**).

La production de bio-éthanol par la levure est une industrie en croissance en raison des exigences énergétiques et environnementales (**Teixeira et al., 2009**).

La réussite des fermentations alcooliques dépend de la capacité d'utilisation des souches de levure des facteurs de stress survenant au cours du processus. Il s'agit notamment de la pression osmotique imposée par concentration

initial élevée de sucre et le stress induits par les produits finaux de fermentation ou sous-produits tels que l'éthanol et l'acétate. A titre indicatif, l'éthanol est un solvant qui possède des effets toxiques à forte concentration pendant sa fermentation sur les levures (**Teixeira et al., 2009**).

I.6. Conditions de culture de *Saccharomyces cerevisiae*

La croissance d'un micro-organisme peut être considérée comme une série d'interaction entre les cellules et l'environnement (**Bacha, 2008**). Les exigences de culture de *Saccharomyces cerevisiae* sont les suivantes:

- **Le pH:** *Saccharomyces cerevisiae* préfère un milieu acide pour croître, pour lequel la plupart des bactéries ne se développent pas. Elle favorise un pH compris entre 4 et 4.5 (**Revuz, 1979**).
- **La température:** ce sont des mésophiles cultivées à une température qui varie de 25°C à 35°C (**Larpen et Gourgoud, 1985**).
- **L'aération:** la levure s'adapte à deux modes de vie en présence et en absence d'oxygène (**Revuz, 1979**), donc, capable de se développer en aérobiose et anaérobiose (**Augère et al., 2006**). Dans le but d'homogénéiser la circulation d'air dans le fermenteur, il est nécessaire d'adapter un gradient d'oxygène sous forme d'air filtré à l'aide d'un coton (**Revuz, 1979**).

I.7. Utilisation industriel

Les espèces de levures, essentiellement *Saccharomyces cerevisiae*, sont largement utilisées dans la fermentation, la vinification ainsi que dans les processus de brassage (**Teixeira et al., 2009**).

La levure *hémiascomycète*, *Saccharomyces cerevisiae*, a été utilisé depuis des siècles pour la production d'aliments fermentés tels que le cidre, la bière et le pain (**Campbell et Reece, 2007; Hennequin et al., 2001**).

Récemment *Saccharomyces cerevisiae* a été considéré comme un complément nutritionnel destiné spécialement pour les sportifs et dans la production du glycérol, des solvants, des protéines et certaines vitamines mais aussi à la revalorisation des déchets agricoles, industriels (**Hennequin et al., 2001; Lecterc et al., 1995**).

Chapitre II. L'invertase

II.L'invertase

II.1. Généralités

Les enzymes sont des protéines dont le rôle biologique est de catalyser les différentes réactions de transformation qui se produisent dans l'organisme ainsi que le contrôle des vitesses auxquelles les processus physiologique se déroulent (**Murray et al., 2003; Wallach, 1997**).

Les enzymes sont des catalyseurs d'une efficacité et d'une spécificité fonctionnelle remarquables. Elles interviennent dans tous les processus de biosynthèse, de dégradation, de régulation et de reproduction (**Mouranche et Costes, 1985**).

Les enzymes présentent une importance majeure dans le contrôle des métabolismes, en effet, lorsque leur fonctionnement est perturbé, elles peuvent être la cause de déséquilibre qui conduit à des pathologies variées (**Wallach, 1997**).

Les enzymes sont présentes chez toutes les espèces vivantes et peuvent, du moins en théorie, en être isolées et purifiées. Les sources d'enzymes industrielles sont principalement d'origine microbienne (**Wallach, 1997**).

Les levure synthétisent et sécrètent plusieurs enzymes, notamment les *β -fructosidases* (**Pol, 1996**). Ce fut l'une des premières enzymes caractérisées par **Persoz** en 1833 (**Bacha, 2008**).

II.2. Définition

Le nom officiel de l'invertase est la β -D-Fructofuranoside fructohydrolase (EC.3.2.1.26), elle appartient à la famille des glycosides hydrolases (**Mohandesi, 2016**). Cette enzyme catalyse la réaction d'hydrolyse des résidus β -fructofuranosyl non-réducteurs terminaux dont les β -fructofuranoside comme le saccharose (**Kulshrestha et al., 2013; Vorster et Botha, 1998**), le raffinose et le stachyose (**Kader, 1990**).

Le mélange résultant de la conversion du saccharose en fructose et en glucose par l'invertase (Figure 4) est appelé sirop de sucre inversé qui a un pouvoir sucrant plus élevé que le saccharose (**Shankar et al., 2013; Persano Oddo et al., 1999**).

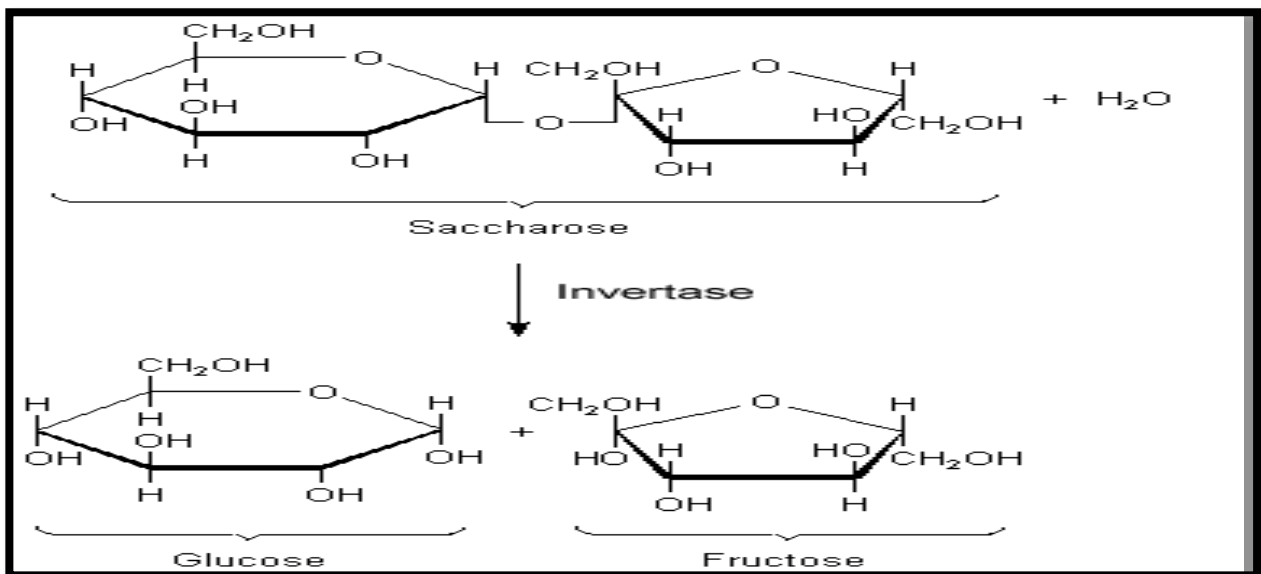


Figure 4 : La réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase (**Dides et Fabre, 2007**).

II.3. Sources et localisation

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est l'organisme de choix pour la production d'invertase lorsque la capacité de fermentation du saccharose est élevée (**Haq et al., 2005**). *Saccharomyces cerevisiae* communément appelé levure de Boulanger est donc la souche principale utilisée pour la production d'invertase commerciale.

L'invertase peut se rencontrer aussi sur la peau de raisins et d'autres espèces végétales tels que le poire japonais, le pois, l'avoine et le riz (**Kulshrestha et al., 2013; Hsaia et al., 2002**), mais généralement les microorganismes comme *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Aspergillus niger* sont considérées comme sources de choix pour l'étude Cinétique (**Kulshrestha et al., 2013**).

La levure *Saccharomyces cerevisiae* produit l'invertase sous deux forme, intra et extracellulaires (**Haq et al., 2005**). La forme extracellulaire est responsable de l'hydrolyse du saccharose pour être utilisé comme source de carbone et d'énergie pour la levure (**Kaiser et Botstein, 1986**). Les deux formes intra et extracellulaires de cette enzyme ayant une structure de gène commune, mais une différence à l'extrémité N-terminale par la présence de deux acides aminés supplémentaires pour l'invertase extracellulaire. Les deux formes d'invertase hydrolysent le saccharose en sucre inverti avec la même efficacité (**Allnajar, 2001**).

Selon **Reddy et Maley (1996)** ainsi que **Larpent (1991)**, l'espace périplasmique est le seul site de localisation, sous forme d'homo-octamère, de l'invertase et de la phosphatase acide chez les levures.

II.4. Structure

Le gène SUC2 est un gène structural de *Saccharomyces cerevisiae*, codant pour l'expression de l'invertase (**Kaiser et Botstein, 1986**).

L'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* est une volumineuse glycoprotéine de 532 acides aminés, comportant deux sous-unités de protéines identiques d'environ 61KDaltons. Un pourcentage important de cette masse, correspond à des glucides qui sont sous forme de chaînes d'oligosaccharides N-liées du type mannose élevé. A titre d'exemple, les oligosaccharides représentent 50% de la masse de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* commercialisée par SIGMA (**Acosta et al., 2000**).

L'invertase existe sous deux formes, intra et extracellulaire, chez les levures. La forme extracellulaire est une glycoprotéine contenant environ 50% de glucides, 5% de mannose, 3% de glucosamine avec un poids moléculaire de 270000 daltons (**Kulshrestha et al., 2013; Reddy et Maley, 1990; Kern et al, 1993**), tandis que la forme intracellulaire est un dimère d'un poids moléculaire de 135000 daltons, cette forme mineur est non glycosylée (**Reddy et Maley, 1990**). Les séquences d'acides aminés, en particulier l'Invertase interne,

ne contiennent pas de cystéine. Les deux enzymes sont inhibées par l'iode et réactivées par le mercaptoéthanol (**Kulshrestha et al., 2013**).

L'invertase se trouve aussi chez les plantes, il existe trois iso-formes différentes dans les propriétés biochimiques et la localisation cellulaires (**Kulshrestha et al., 2013**).

II.5. Mode d'action

La formation du complexe enzyme-substrat est régit par le modèle de l'ajustement induit et par le modèle de simple complémentarité stérique (**Mouranche, 1985**).

Le site ou le centre actif d'une enzyme est une région où se fixe et se transforme le substrat, ce site possède deux fonctions essentielles :

- Intervient dans la reconnaissance spatiale du substrat en formant avec lui des liaisons non covalentes.
- Participe à la transformation chimique du substrat (**Bacha, 2008**)

Le mécanisme réactionnel d'hydrolyse du saccharose par l'invertase (Figure 5), implique la protonation de l'oxygène glycosidique du saccharose par le donneur de proton (cystéine 205), suivie par l'attaque nucléophile sur le carbone anomérique du fructose par le groupe carboxylate de l'acide aspartique (Asp23). Ceci a pour résultat, la formation d'un complexe covalent fructosyl-enzyme associé au dégagement du glucose. En suite, l'acide glutamique (Glu 204) agit comme base en soustrayant un proton d'une molécule d'eau, ce qui permet au

groupe hydroxyle restant de déplacer le fructose et de reconstituer les résidus actifs originaux (**Reddy et Maley, 1996**).

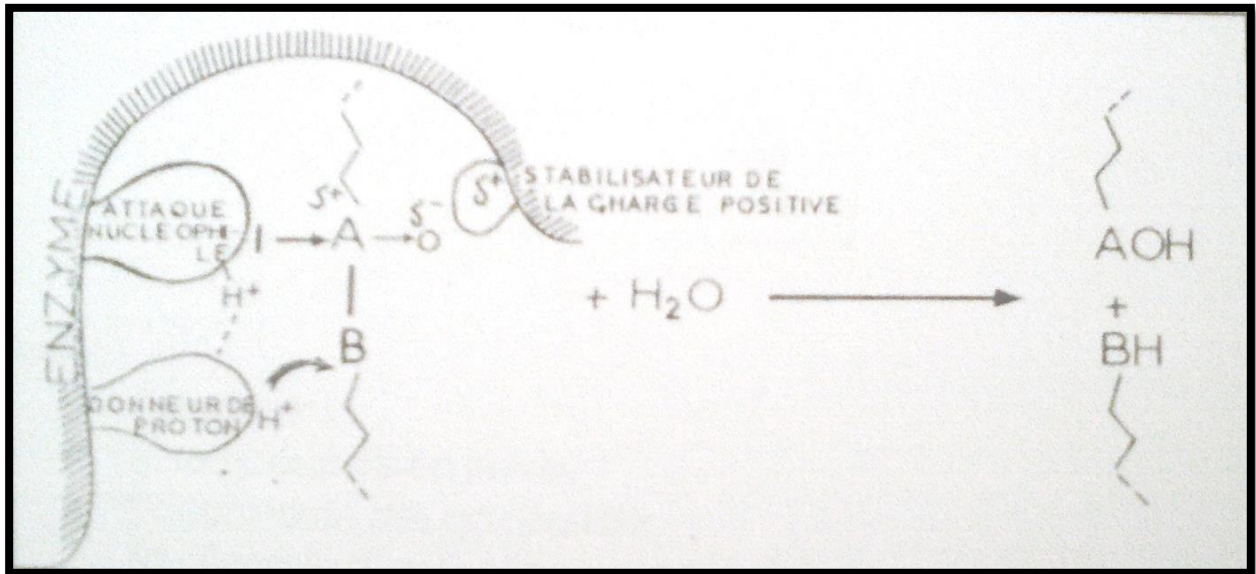


Figure 5 : mécanisme de substitution nucléophile des hydrolytiques (**Mouranche et Costes, 1985**).

Naumoff (1999) précise que, pour la souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*, le résidu glutamate sert de donneur de proton dans l'hydrolyse de la liaison glycosidique.

II.6. Facteurs influençant l'activité enzymatique de l'invertase

La complexité de l'étude des réactions enzymatiques provient de ce qu'elles dépendent non seulement de l'interaction entre l'enzyme et son substrat, mais également du milieu réactionnel dans lequel elles se produisent, c'est-à-dire, d'une part de ses constituants, d'autre part de ses caractéristiques physicochimiques. En effet, la modification de l'un des paramètres

(pH, température,...) peut être susceptible d'entraîner un changement significatif de l'activité (**Wallach, 1997**).

II.6.1. Facteurs physicochimique

II.6.1.1. La température

La température a un effet direct en accélérant les vitesses des réactions enzymatique, fournissant ainsi l'énergie nécessaire au franchissement de la barrière de l'énergie d'activation. Le phénomène est classique en cinétique chimique, et la variation d'une constante de vitesse en fonction de la température peut s'écrire sous la forme :

$$K=Z \exp \left(\frac{-E_a}{RT} \right)$$

Avec :

Z : Constante,

T : Température en Kelvin,

R : Constante des gaz parfaits,

Ea: Energie d'activation de la réaction.

D'autre part, la température a un effet sur la structure tridimensionnelle des enzymes, entraînant progressivement la dénaturation et la désactivation (**Wallach, 1997**). Donc, le choix de la température d'analyse est extrêmement important puisque la façon dont les enzymes réagissent à une température donnée est fondamentale (**Daniel et Danson, 2013**).

L'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae* présente une activité maximale dans un intervalle de température de [35 et 40 °C] (Arruda et Vitolo, 1999).

II.6.1.2. Le pH

Le pH a une influence sur la structure de l'enzyme. La modification des charges des chaînes latérales des acides aminés peut entraîner la dénaturation et donc la désactivation de la protéine enzymatique (Wallach, 1997).

Le pH optimum de l'invertase se situe entre 4 et 5 (Wang, 1996; Kader, 1990).

II.6.1.3. La concertation en substrat

Les réactions enzymatiques sont traitées comme s'il n'y avait qu'un seul substrat et un seul produit. Bien que cela soit le cas de quelque réaction catalysée par des enzymes, la plupart de ces réactions comportent deux substrats ou plus et deux produits ou plus. Cependant malgré cette considération la discussion reste valable.

Si on augmente la concentration du substrat [S] en maintenant constante toutes les autres conditions, la vitesse initiale mesurée (V_{in} : vitesse mesurée quand une très petite quantité du substrat réagit) augmente jusqu'à une valeur maximale (V_{max}). Donc, la vitesse augmente avec l'augmentation de la concentration en substrat jusqu'à un point où l'enzyme est dite « saturée » par le substrat, la vitesse

initiale mesuré atteint alors une valeur maximale qui ne peut pas être modifiée par une augmentation de la concentration du substrat (Murray *et al.*, 2003).

Le saccharose ou sucre de table est le disaccharide le plus abondant chez le règne végétal, son nom systématique est l'O- α -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2) β -D-fructofuranoside (Voet et Voet, 2004). L'hydrolyse du saccharose en D-glucose et D-fructose s'accompagne d'un changement du sens de rotation optique, le produit de la réaction est appelé « **sucre inversé** » et l'enzyme qui catalyse cette hydrolyse est appelée « invertase » (Voet et Voet, 2004; Durand et Monsan, 1982).

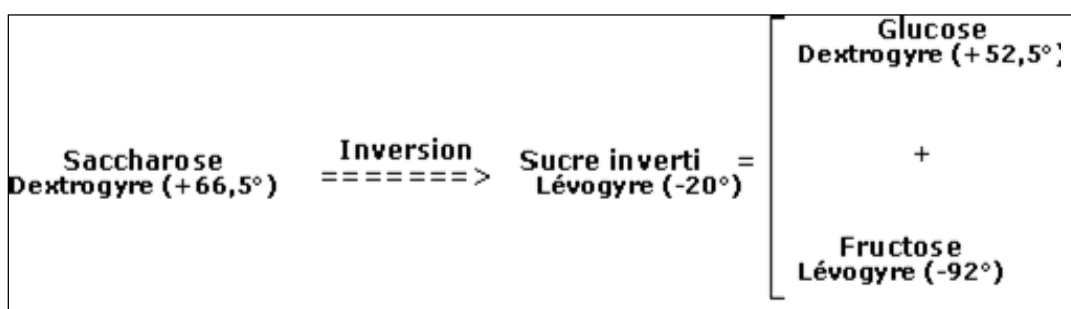


Figure 6 : Inversion du saccharose par l'invertase

II.6.2. Facteurs chimiques

Indépendamment des facteurs physicochimiques liés au milieu réactionnel de nombreuses molécules peuvent modifier la réaction enzymatique. Les molécules chimiques peuvent réagir en formant des liaisons covalentes. Lorsque ces derniers se situent dans ou au voisinage du site actif, l'enzyme est généralement inactivée d'une manière irréversible, à moins d'éliminer l'effecteur par une autre réaction.

II.6.2. 1. Les inhibiteurs

On appelle inhibiteur tout composé dont la fixation sur une enzyme engendre son inactivation partielle ou totale, ce qui se traduit par une diminution de la vitesse de la réaction.

L'inhibition compétitive par le produit de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase est un phénomène très rencontré (**Chaplin et bucke, 1990**).

II.7. Applications de l'invertase

- Un mélange équimolaire de fructose et de glucose (sucre inversé) obtenu par hydrolyse enzymatique du saccharose présente un pouvoir sucrant plus élevé que le saccharose (**Garde, 1997**).
- La production de sirop de sucre non cristallisable à partir du saccharose est l'une des principales applications de l'invertase.
- Le sirop inversé a des propriétés hygroscopiques plus élevées qui le rendent utile dans la fabrication des bonbons, des fondants, des boissons alcoolisées,...etc.
- L'hydrolyse enzymatique par l'invertase est également utilisée dans la fabrication de miel artificiel et d'agents plastifiants qui sont utilisés comme produits de beauté.
- La formation d'agents aromatisants indésirables ainsi que les impuretés colorées ne se produisent pas lors de l'hydrolyse enzymatique du saccharose contrairement à l'hydrolyse acide (**Kulshrestha et al., 2013**).

Matériels et méthodes

I. Principaux réactifs utilisés

- Acétate de sodium.
- Bicarbonate de sodium.
- Acide acétique.
- D (+) saccharose.
- D (+) glucose.
- D (-) fructose.
- Tartrate double de sodium et de potassium.
- Sulfate de cuivre.
- Levure de boulanger : *Saccharomyces cerevisiae*.
- BSA (*Bovine Serum Albumin*).
- Hydroxyde de sodium.
- Iodure de Potassium.
- Réactif DNSA.
- 3,5 Dinitro-salicylique

II. Extraction de l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*

II.1. Protocole d'extraction

Il s'agit de l'extraction d'une enzyme endocellulaire. Les méthodes d'extraction s'avèrent non spécifique et se basent toutes sur la rupture membranaire en assurant cependant l'intégrité des protéines enzymatiques (Kati, 2012).

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme source d'enzyme pour cette étude. Elle est achetée dans le commerce. L'extraction de l'invertase se fait par plasmolyse suivie d'autolyse assistée, c'est-à-dire de digestion par enzyme protéolytique (Minifie, 1999). L'extraction de l'invertase consiste en la succession des étapes suivantes :

- ✓ Préparer 100 ml d'une solution aqueuse de bicarbonate de sodium 0,1M et d'acétate sodium 0,01M.
- ✓ Ajouter 50 g de levure de boulanger sèche, puis couvrir et agiter jusqu'à la dissolution de la levure.
- ✓ Laisser 45 heures à température ambiante (plasmolyse).
- ✓ Ajouter après 100 ml d'eau distillée et bien homogénéiser.
- ✓ Centrifuger à 4000 tr/min pendant 15 minutes puis récupérer le surnageant et y ajouter de l'acide acétique pour acidifier la préparation jusqu'à un pH de 4 environ (l'acide acétique est employé comme conservateur).

✓ Centrifuger cette préparation une deuxième fois à 4000 tr/min pendant 15 minutes et récupérer le surnageant qui contient la plupart de l'enzyme en ajustant le pH à 4 de nouveau si nécessaire.

✓ L'extrait enzymatique ainsi obtenu est limpide et de couleur jaune. Il est conservé à 4°C.

II.2. Dosage des protéines de la préparation enzymatique

II.2.1. Dosage des protéines par la méthode de biuret

II.2.1. 1. Principe

La réaction de biuret est peu sensible mais pratique et rapide. On dose la liaison peptidique par les ions Cu^{2+} en milieu alcalin en présence d'un complexant comme le tartrate (**Pelmont, 1993**). La détermination de l'activité spécifique d'un extraite enzymatique implique d'y doser les protéines. En milieu alcalin, le cuivre divalent réagit avec les liaisons peptidiques des protéines pour former le complexe du biuret, de coloration bleu violet, dont le pic d'absorption se situe à 540nm. Les ions Cu^{2+} du réactif biuret étant en excès, l'absorbance du complexe est proportionnelle à la concentration protéique. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration en protéines (**coutouly, 1992**).

II.2.1.2. Préparation de la gamme d'étalonnage

Pour déterminer la concentration en protéines de la préparation enzymatique, il faut tracer une courbe d'étalonnage, en utilisant l'albumine du sérum bovin (BSA) comme protéine étalon.

- ✓ On prépare une solution mère à 6 g/l d'albumine du sérum bovin (protéine étalon).
- ✓ Dans une série de 18 tubes à essais (3 tubes pour chaque essai), on effectue les différentes dilutions comme suit:

Tableau 3 : Dilutions de la solution mère de l'albumine du sérum bovin (BSA).

Numéro de tube	1	2	3	4	5	6	7
Volume de la solution mère de BSA (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2
Volume du tampon acéto-acétique (ml)	2	1,8	1,6	1,4	1,2	1	0,8
Concentration finale en protéine (g/l)	0	1	2	3	4	5	6

- ✓ On ajoute à chaque tube 3 ml du réactif de biuret, on laisse incuber pendant 30 min à température ambiante et à l'abri de la lumière (La composition du réactif de biuret est indiquée dans la partie « annexes »).
- ✓ L'absorbance correspondante à chaque tube est mesurée à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre contre un blanc.
- ✓ La figure 7 représente la droite d'étalonnage obtenue.

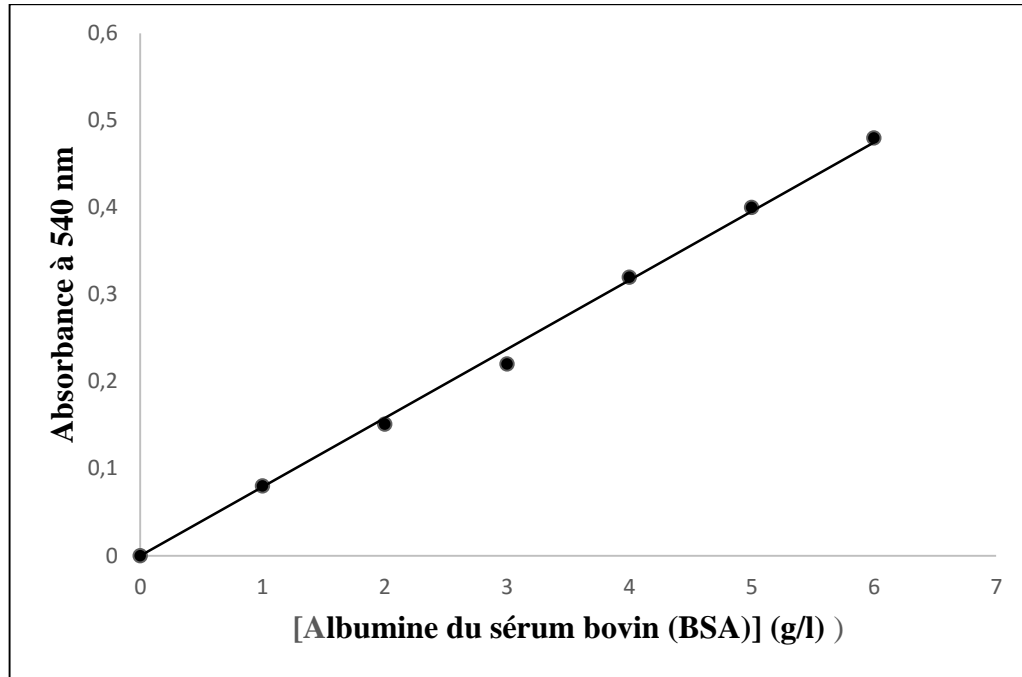


Figure 7 : Droite d'étalonnage pour le dosage des protéines par la méthode du biuret (Absorbance = $0,0791 \times [\text{Protéines}]$; $r^2 = 0,9972$).

II.2.1.3. Détermination de la concentration protéique

- ✓ Dans une série de tubes à essais, on effectue les différentes dilutions suivantes à partir de la solution mère enzymatique :

Tableau 4 : Dilutions de la solution mère enzymatique.

Numéro de tube	1	2	3	4	5
Volume de la solution mère enzymatique (ml)	0	0,25	0,5	0,75	1
Volume du tampon acéto-acétique (ml)	1	0,75	0,5	0,25	0

- ✓ On ajoute à chaque tube 3 ml du réactif de biuret, on laisse incuber pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

✓ On mesure l'absorbance de chaque tube à 540nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

La concentration en protéines de l'extrait enzymatique est déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage obtenue. Elle est calculée par la formule suivante:

$$[\text{Protéine}] \text{ (g/l)} = \frac{\text{Absorbance de l'échantillon} \times \text{Facteur de dilution}}{\text{Pente de la droite d'étalonnage (unité d'absorbance.l.g-1)}}$$

La concentration en protéine de la β -fructosidase est calculée en prenant la moyenne des quatre concentrations déterminées expérimentalement.

II.2.2. Dosage des protéines par absorptiométrie directe dans l'ultraviolet

II.2.2. 1. Principe

Les protéines ont une absorption maximale dans le domaine d'ultraviolet à 280 nm, due aux chaînes latérales de leurs acides aminés aromatiques (tyrosine et tryptophane) (**Loncle, 1992; Kamoun, 1997**). La mesure de l'absorbance à 280 nm d'un extrait protéique ne constitue pas un dosage précis du fait de la variabilité de la teneur en acides aminés aromatiques et de l'interférence éventuelle avec d'autres molécules, en particulier les acides nucléiques, qui absorbent fortement dans l'ultraviolet, avec un maximum à 260 nm. **Warburg et Christian (1941)** ont étudié les propriétés spectrales des deux macromolécules, protéines et acides nucléiques, et ont développé une méthode pour déterminer la concentration protéique d'un mélange contenant une proportion donnée d'acides nucléiques.

Cette méthode requiert la mesure de l'absorption à deux longueurs d'ondes (280 nm pour les protéines et 260 nm pour les acides nucléiques). Ces valeurs peuvent alors s'intégrer dans l'équation suivante (**Kamoun, 1997**) :

$$[\text{Protéines}](\text{g/l}) = 1,55 A_{280\text{nm}} - 0,76 A_{260\text{nm}}$$

Avec :

A : absorbance.

La mesure de l'absorbance à 280 nm permet une estimation rapide et sensible et est abondamment utilisée pour le suivi des fractions protéiques dans les techniques de séparation, d'autant plus qu'elle est non dénaturante et permet de récupérer la solution protéique.

II.2.2. 2. Mode opératoire

- ✓ La mesure de l'absorbance dans l'ultraviolet est effectuée à partir des dilutions suivantes de l'extrait d'invertase.

Tableau 5 : Dilutions de la solution mère enzymatique.

Numéro du tube	1	2	3
Dilution	1/20	1/10	3/20
Volume de l'extrait d'invertase (ml)	1	2	3
Volume de tampon acéto-acétique (ml)	19	18	17

- ✓ L'absorbance est mesurée pour chaque dilution de la solution mère enzymatique à 280 nm et à 260 nm.

III. Dosage des sucres réducteurs

III.1. Principe

En milieu alcalin, à chaud et en présence de sucres réducteurs, l'acide 3,5 dinitro-salicylique (3,5-DNSA) est réduit en acide 3- amino 5-nitro-salicylique, produit de couleur jaune orangé, selon la figure 8. Ce dosage est mis au point pour donner la quantité de sucres réducteurs présents dans la solution à doser.

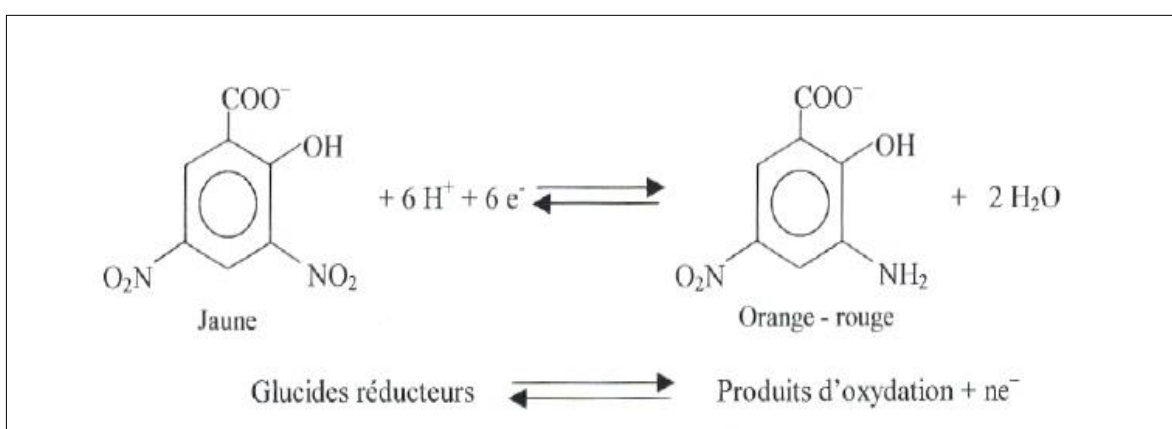


Figure 8: Réaction d'oxydation des sucres réducteurs par l'acide 3,5 Dinitro-salicylique (DNSA).

III.2. Préparation de la gamme d'étalonnage

La mesure est effectuée après la préparation de la solution mère de sucre inverti à 5mM (Fructose 2,5mM + Glucose 2,5mM).

- ✓ Dans une série de tubes à essais à vis, on met à raison de 0,75ml par tube les différentes dilutions de la solution mère. Puis, on ajoute 0,25ml du tampon acéto-acétique (0,1M – pH 4,6).
- ✓ On ajoute 1ml du réactif DNSA et on agite.

- ✓ La réaction sucres réducteurs - DNSA s'effectue dans un bain-Marie bouillant pendant 5 min, ensuite il faut refroidir les tubes rapidement dans un récipient d'eau glacée puis ajouter 10 ml d'eau distillée dans chaque tubes.
- ✓ La densité optique du contenu de chaque tube est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 530 nm, contre un blanc réactif contenant du tampon acéto-acétique.

La figure 9 représente la droite d'étalonnage obtenue.

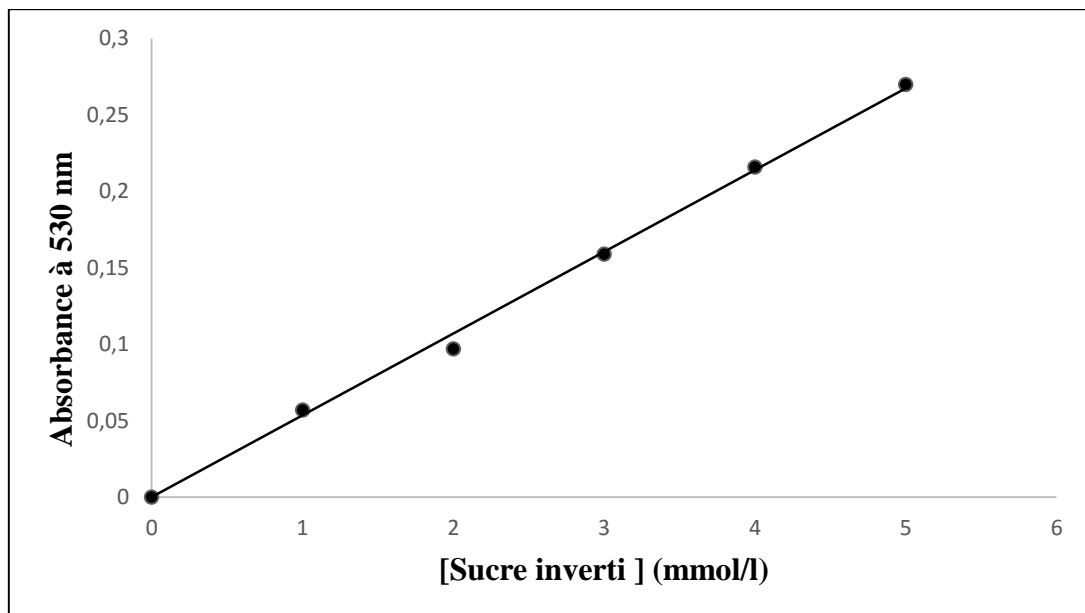


Figure 9 : Droite d'étalonnage pour le dosage des sucres réducteur (Absorbance = 0,0535 X [Sucre inverti]; $r^2= 0,9976$).

IV. Détermination de l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique

En générale, il est très difficile de mesurer directement la concentration d'enzyme dans un milieu donné, car cette dernière se trouve rarement à l'état pure, on mesure plutôt une grandeur proportionnel à la concentration d'enzyme qui est l'activité enzymatique. L'activité d'une enzyme se traduit par une quantité de substrat transformée au cours du temps, qui s'exprimé par des Unité international (UI) ou Katal (kat) (**Pelmont, 1993**).

La détermination de l'activité enzymatique de l'extrait enzymatique de l'invertase est effectuée après avoir fait réagir une dilution (1/150) de la préparation enzymatique et une solution de saccharose à 0,1M dans du tampon acétate (0,1M - pH 4,6).

✓ Dans une série de tubes à vis, on fait réagir 0,75ml de saccharose et 0,25ml de la solution d'enzyme. La réaction enzymatique se déroule à 25°C pour les durées d'incubation suivantes : 0- 30- 60- 90- 120- 150- 180- 210- 240- 270- 300 secondes.

✓ Le réactif d'arrêt de la réaction DNSA est ajouté à raison de 1ml par tube.

Remarque: Pour le temps 0 (blanc réactif), mettre dans l'ordre, le réactif DNSA, 1 ml d'eau distillée, solution de saccharose puis la solution d'enzyme.

✓ La réaction sucres réducteurs-DNSA s'effectue dans un bain-Marie bouillant pendant 5 min, ensuite les tubes sont refroidis rapidement dans un récipient contenant de l'eau glacée.

✓ 10 ml d'eau distillée sont ajoutés dans chaque tube afin de déterminer la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre à 530 nm, contre un blanc réactif correspondant au temps « 0 ».

Remarque : Chaque mesure est répétée 3 fois.

IV.1. Détermination de la vitesse initiale de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase

L'activité enzymatique est déterminée à partir de la mesure de la vitesse initiale de la réaction, cette vitesse doit être exprimée par la quantité de substrat transformé par unité de temps et par unité de volume du milieu réactionnel. Elle est déterminée par la formule suivante :

$$V_{in} = \frac{b \cdot 10^3}{2 \cdot b'}$$

Avec :

V_{in}: Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

b: Pente de la droite « absorbance du milieu réactionnel en fonction du temps » (unités d'absorbance. Min^{-1}).

b': Pente de la droite d'étalonnage.

IV.2. Détermination de l'activité enzymatique volumique de l'invertase

L'activité enzymatique peut être exprimée en unités internationales. Une unité internationale (UI) est la quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une μ mole de substrat par minute dans des conditions définies et si possible optimales. L'activité volumique est déterminée par l'équation suivante:

$$AV = \frac{Vin \cdot Vr \cdot F}{10^3 \cdot V_e}$$

Avec :

Vin : Vitesse initiale d'hydrolyse du saccharose ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

AV: Activité volumique (UI/ml).

Vr : Volume du milieu réactionnel (1 ml).

Ve: Volume d'enzyme (0,25 ml).

F: Facteur de dilution.

IV.3. Détermination de l'activité spécifique de l'invertase

L'activité spécifique est le nombre d'unité internationale d'enzyme par unité de masse en protéine totale de la solution enzymatique à étudier (**Pelmont, 1993**). L'activité spécifique est une mesure de pureté d'un échantillon d'enzyme, elle augmente au cours de la purification. Elle est déterminée par la formule suivante :

$$As = \frac{AV}{[\text{Protéine}]}$$

Avec :

As : Activité spécifique (UI/mg).

AV : Activité volumique (UI/ml).

[Protéine] : Concentration en protéine (mg/ml).

V. Détermination du pH optimum et de la température optimale de de l'invertase

V.1. Détermination du pH optimum

En pratique, il est important de définir la zone de fonctionnement du système enzymatique étudié dans la gamme de pH. Pour chaque valeur de pH testée (3,2 - 3,4 - 3,8 - 4,2 - 4,4 - 4,6 - 4,8 - 5,2 - 5,6), on prépare une solution d'enzyme diluée 150 fois et une solution de saccharose à 0,1M.

✓ Pendre une série de tubes à essais, et y mettre 0,75 ml de la solution du saccharose à 0,1 M (déjà incubée 5 min à 25°C) et 0,25 ml de la solution enzymatique diluée à différents pH.

✓ Agiter les tubes et incuber 4 min à 25°C puis ajouter dans chacun 1 ml de DNSA.

✓ La réaction sucres réducteurs-DNSA se déroule dans un bain-Marie bouillant pendant 5 min.

✓ Faire Refroidir les tubes rapidement dans un récipient d'eau glacée et y ajouter dans chacun 10 ml d'eau distillée.

✓ A l'aide d'un spectrophotomètre, on lit la densité optique du contenu de chaque tube à 530 nm, contre un blanc réactif correspondant au temps « 0 ».

V.2. Détermination de la température optimale

La température a une influence sur la vitesse des réactions enzymatiques comme pour n'importe quelle réaction chimique. Pour déterminer la température optimale, on mesure l'activité enzymatique à différentes températures.

✓ Pendre une série de tubes à essais (correspondant aux températures : 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80°C) contenant 0,75 ml du substrat (le saccharose à 0,1M), et incuber pendant 3 min aux différentes températures correspondantes à chaque tube afin de porter le contenu de ces tubes à la température de l'expérience. Puis introduire un volume de 0,25ml de la solution enzymatique de l'invertase dilué 150 fois préalablement porté aux mêmes températures pendant 1min.

✓ Bien agiter le contenu du tube et incuber au bain-marie à la température appropriée pendant 4min. La réaction est arrêtée en ajoutant 1 ml du réactif DNSA.

✓ Dans un bain-Marie, faire bouillir les tubes pendant 5 min, puis les refroidir rapidement avec de l'eau glacée et ajouter 10 ml d'eau distillée dans chacun.

✓ on lit la densité optique à 530 nm, contre un blanc réactif correspondant au temps « 0 ».

VI. Détermination des paramètres cinétiques de l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae*

Afin de déterminer les paramètres cinétiques de l'invertase, l'extrait enzymatique dilué 150 fois dans de tampon acéto-acétique 0,1M-pH 4,6 est mis en présence de la solution de saccharose à différentes concentrations: 0,04- 0,08- 0,1- 0,2- 0,3M.

Pour chaque concentration testée en saccharose, le même protocole expérimental de la détermination de l'activité enzymatique est réalisé pour l'étude de l'influence de la concentration en substrat (*cf.* paragraphe « IV » de la partie « matériel et méthodes »). Le temps de réaction est de 4min.

Résultats et discussion

I. Recherche de l'activité de l'invertase dans la préparation enzymatique

L'extrait enzymatique de l'invertase obtenu à partir de la levure *Saccharomyces cerevisiae* est convenablement dilué et utilisé pour l'étude de la cinétique d'hydrolyse du saccharose.

La figure 10 permet de constater qu'en présence de l'extrait préparé, le saccharose est hydrolysé en glucose et en fructose. En effet, lors d'essais témoins réalisés en l'absence de l'invertase, le substrat n'était pas hydrolysé. Il est donc vraisemblable que l'enzyme contenue dans l'extrait soit une invertase. Selon **Kaiser et Botstein** (1986), la levure de boulanger est la source la plus commune de cette enzyme.

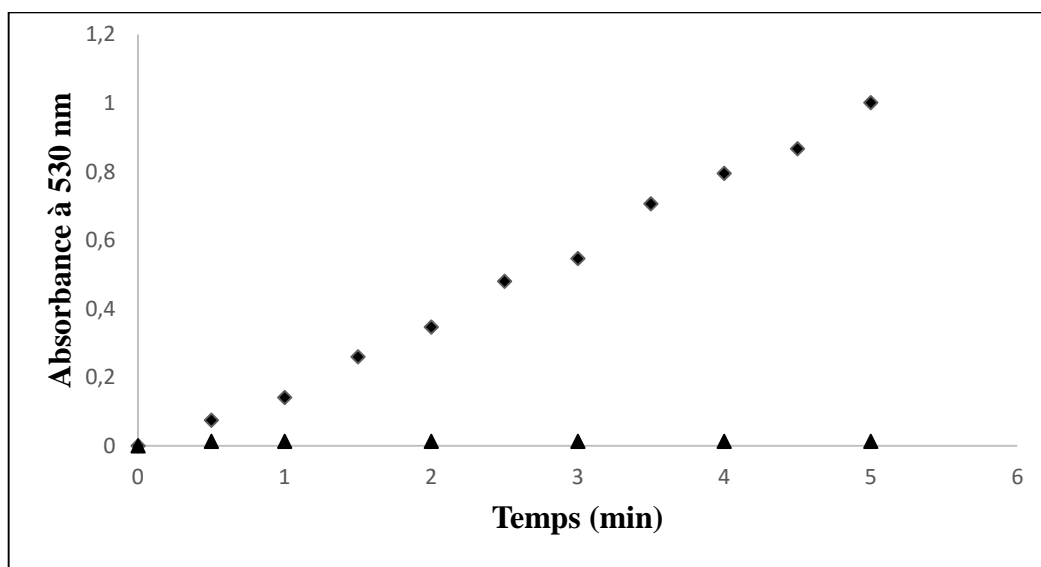


Figure 10: Cinétique d'hydrolyse du saccharose en présence (◆) et en absence (▲) d'extrait enzymatique. ([Saccharose]=0,1 M; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); tampon acétate 0,1M-pH 4,6 ; 25°C).

II. Mesure des activités volumique et spécifique de l'invertase

Le tableau 6 regroupe les résultats obtenus des activités volumique et spécifique de l'invertase dans les conditions opératoires standards ([Saccharose] = 0,1M; Tampon acéto-acétique (0,1M - pH 4,6); Température = 25°C; Dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); Durée de la réaction= 4 min).

Tableau 6 : Activités volumique et spécifique de l'invertase dans les conditions standards.

Concentration en protéines (g/l)	Vitesse initiale ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{l}^{-1}$)	Activité volumique (UI/ml)	Activité spécifique (UI/mg)
13,21 \pm 0,83	1,858.10 ³ \pm 9,01	1,114.10 ³ \pm 5,40	8,439. 10 \pm 0,40

Le dosage des protéines a été effectué par deux méthodes, l'absorptiométrie directe dans l'ultraviolet et la méthode colorimétrique de biuret (Tableau 7). La concentration en protéines de l'extrait enzymatique mentionnée dans le tableau 6 est obtenue par la méthode du biuret. Cette méthode a donné des résultats du même ordre de grandeur mais supérieure à ceux obtenus par absorption dans l'ultraviolet à 280 nm comme le montre le tableau 7.

En effet, l'absorption directe dans l'ultraviolet ne constitue pas un dosage précis du fait de la variabilité de la teneur en acides aminés aromatiques des protéines et de l'interférence éventuelle avec d'autres molécules. La méthode du biuret a donc été adoptée dans cette étude pour le dosage des protéines en raison de

sa fiabilité, de sa rapidité et essentiellement de la non influence de la nature des protéines (**Lemerini, 2006**).

Tableau 7 : La concentration en protéines par absorptiométrie directe dans l’ultraviolet et par méthode du biuret de l’extraite enzymatique.

	Méthode du biuret	Absorptiométrie directe dans l’ultraviolet
	[Protéine](g/l)	
Extrait enzymatique de l’invertase	$13,21 \pm 0,83$	$10,63 \pm 2,50$

III. Détermination du pH optimum de l’invertase

La figure 11 représente l’évolution de l’activité enzymatique en fonction du pH du milieu réactionnel, qui explique l’effet du pH sur la préparation enzymatique. Les résultats obtenus font ressortir une zone où l’activité enzymatique est maximale (97,12 -100%). L’intervalle de pH correspondant est du pH 4,2 à 4,6. Dans cette gamme on constate un pic d’activité à pH 4,6.

Arruda et Vitolo (1999) ont obtenu un pH optimum de 4,6 pour l’invertase. Compte-tenu de nos résultats et de ceux de la bibliographie, nous avons choisi de travailler avec une solution tampon acétate 0,1M de pH 4,6.

L’action du pH se traduit par la modification de la conformation et des propriétés de la protéine enzymatique (ionisation des acides aminés) et /ou du substrat (le substrat doit être sous une certaine forme, qui n’est pas nécessairement la forme de la neutralité) (**Kati, 2012**).

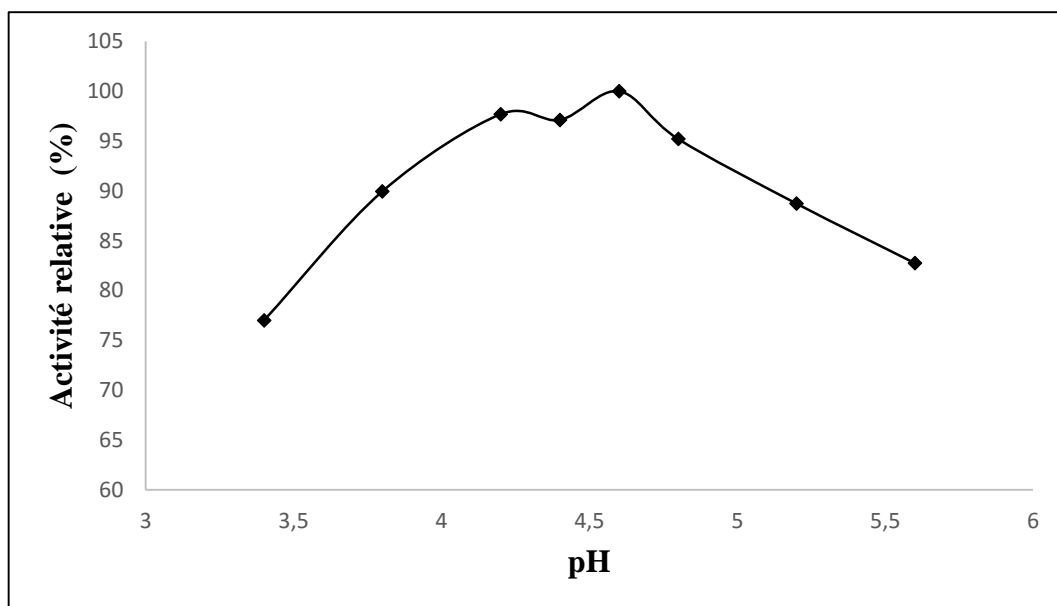


Figure 11: Effet du pH sur l'activité de l'invertase ([Saccharose]=0,1 M; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); 25°C; durée de la réaction 4 min).

IV. Détermination de la température optimale de l'invertase

La représentation graphique « figure 12 » représente l'évolution de l'activité enzymatique de la β -fructosidase en fonction de la température et fait apparaître deux phases bien distinctes qui correspondent à deux phénomènes.

Dans la partie croissante de cette courbe (de 15°C à 60°C), on assiste à une augmentation de l'activité enzymatique. Ce processus résulte d'une augmentation de l'agitation thermique des molécules avec l'augmentation de température. Les chocs entre les molécules de saccharose et l'invertase sont donc favorisés. L'activité enzymatique vaut 378,5 UI/ml à 15°C et 4211,21 UI/ml à 65°C.

Dans la partie décroissante de cette courbe (au-delà de 60°C) l'activité enzymatique diminue à cause de la dénaturation thermique de la protéine enzymatique. Elle est due à l'agitation moléculaire qui détruit les liaisons faibles stabilisatrices de la structure spatiale de l'enzyme. La température élevée perturbe l'activité enzymatique et peut conduire à une inactivation irréversible de l'enzyme.

L'activité enzymatique maximale (4211,2 UI/ml) est obtenue à une température de 60°C, cette température correspond à la température optimale de l'invertase. **Alnajjar (2001)** a déterminé la même valeur de température optimale pour l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae*.

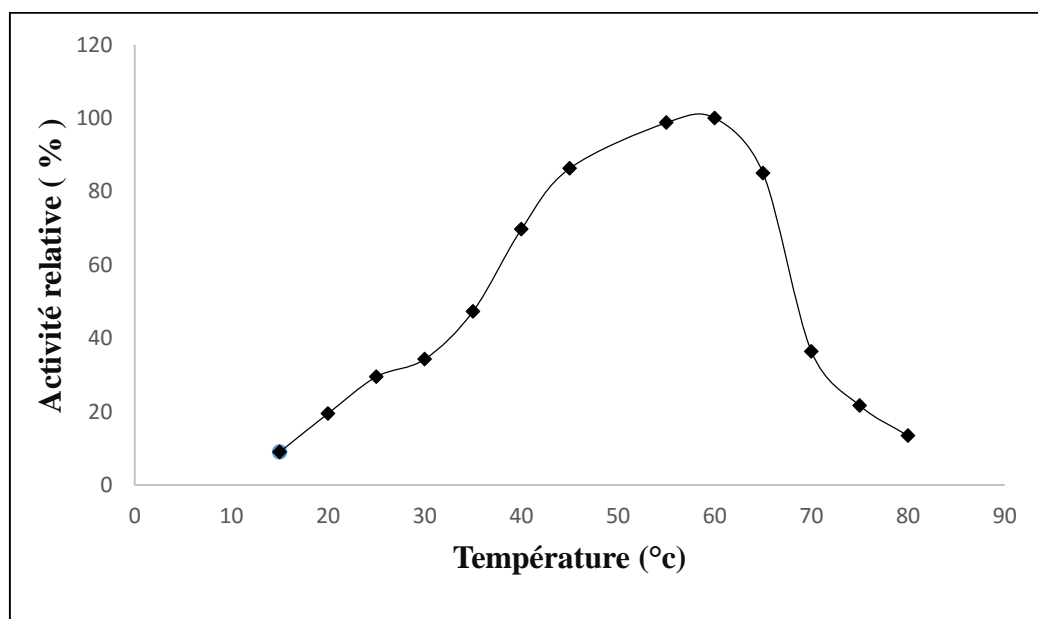


Figure 12 : Effet de la température sur l'activité de l'invertase ([Saccharose]= 0,1 M; dilution de l'enzyme 1/150 (V/V); tampon acétate 0,1M-pH 4,6; durée de la réaction 4 min).

L'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase est estimée à partir de la partie croissante de la courbe d'activité relative en fonction de la température (figure 12).

La figure 13 représente le logarithme népérien « Ln » de la vitesse initiale d'hydrolyse en fonction de l'inverse de la température absolue. D'après la loi d'Arrhenius, on obtient une droite de pente « $-E_a/R$ » ou E_a est l'énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse du saccharose et R est la constante des gaz parfaits.

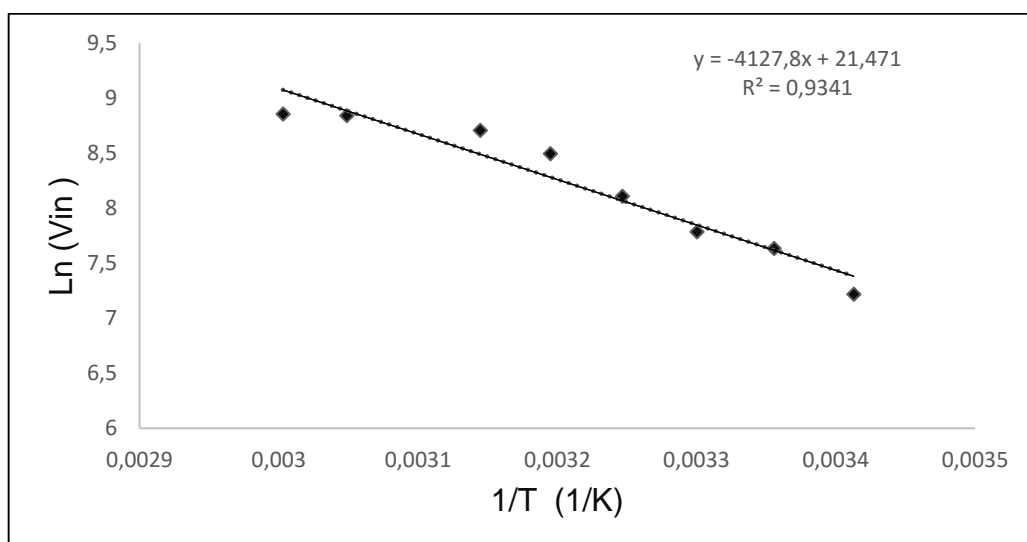


Figure 13 : Graphique d'Arrhenius pour l'activation thermique de l'invertase. (cf. figure 12 pour les conditions opératoires).

L'énergie d'activation déterminée à partir de la figure 13 est égale à $34,318 \text{ KJ.mol}^{-1}$. **Gouzi (2002)** a déterminé une énergie d'activation de 45 KJ.mol^{-1} dans les conditions opératoires suivantes ($[\text{Saccharose}] = 0,25 \text{ M}$; dilution de la préparation enzymatique : 1/500 (v/v); tampon acéto-acétique 0,1M – pH 4,8; temps de réaction: 0,5 min).

V. Détermination des paramètres cinétiques de l'invertase dans les conditions standards

La variation de la concentration en substrat (le saccharose) dans le milieu réactionnel et dans des conditions standards permet de déterminer les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'invertase. Nous avons tout d'abord utilisé la représentation de Michaelis-Menten (figure 14) pour évaluer les constantes cinétiques de notre préparation enzymatique de l'invertase.

$$V_{in} = \frac{V_{max} \times [S]}{V_{max} + [S]}$$

Avec:

V_{in} : Vitesse initiale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$);

V_{max} : Vitesse maximale d'oxydation ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$);

[S] : Concentration en substrat (Saccharose) (mol.l^{-1});

K_m : Constante de Michaelis (mol.l^{-1}); elle correspond à la valeur de [S] pour laquelle $V_{in} = V_{max}/2$.

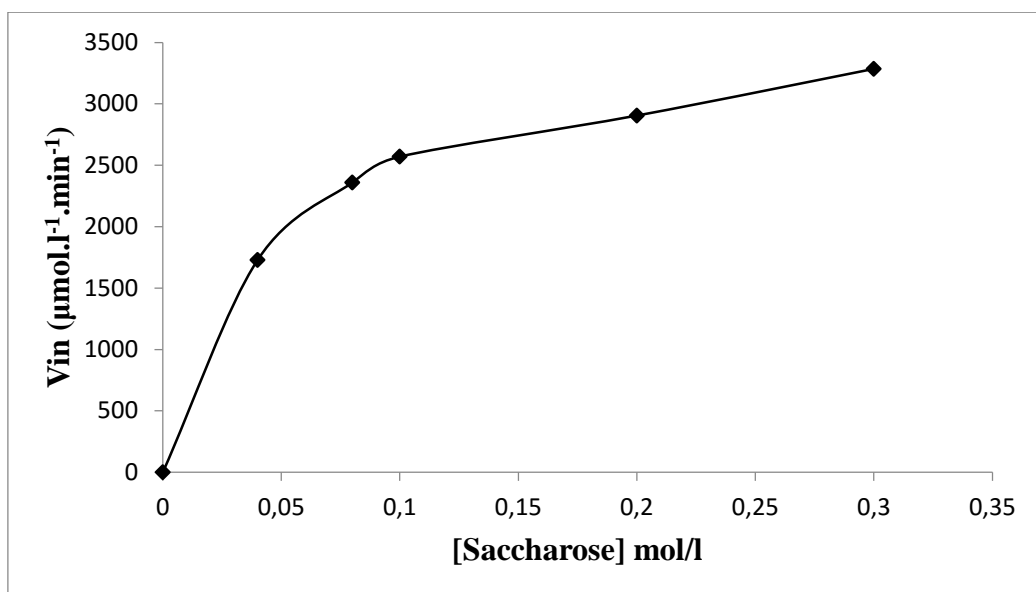


Figure 14 : Représentation de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat selon l'équation de Michaelis-Menten. (Dilution de l'enzyme 1/150 (v/v) tampon acide-acétique 0,1 M - pH 4,6; durée de la réaction ; 4min; 25°C).

Nous avons obtenu à partir de cette courbe:

$$V_{\max} = 3285 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

$$K_m = 0,038 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$r^2 = 0,9644$$

Pour une détermination plus précise des paramètres cinétiques de l'invertase K_m et V_{\max} , il est préférable d'utiliser l'une des nombreuses représentations graphiques, linéarisant les résultats expérimentaux. La représentation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk est la plus employée pour des concentrations non saturantes en substrat (figure 15):

$$\frac{1}{V_{\text{in}}} = \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{max}}}$$

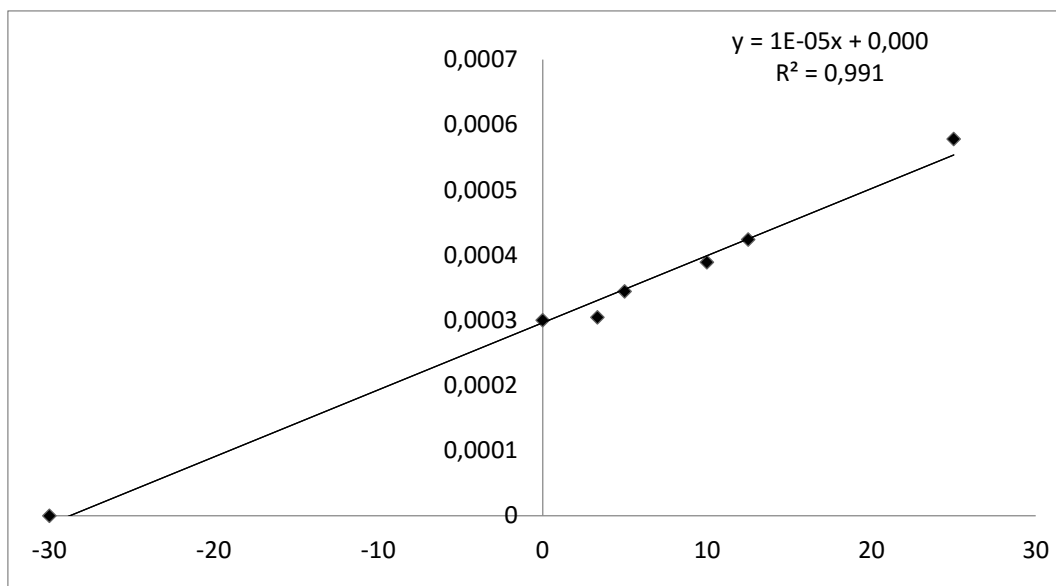


Figure 15 : Représentation en coordonnées inverses de Lineweaver-Burk. (cf. figure 14 pour les conditions opératoires).

Nous avons obtenu les paramètres suivants à partir de la représentation en coordonnées inverses.

$$V_{\max} = 3333,33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

$$K_m = 0,033 \text{ mol.l}^{-1}$$

$$r^2 = 0,991$$

Le tableau 8 résume les paramètres cinétiques de l'invertase.

Tableau 8 : Paramètres cinétiques de l'invertase obtenus à partir des différentes équations.

Equations cinétique	Vmax ($\mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	Km (mol.l^{-1})	r ²
$V_{in} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{V_{\max} + [S]}$	3285	0,038	0,9644
$\frac{1}{V_{in}} = \frac{K_m}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}}$	3333,33	0,033	0,991

En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, on remarque qu'il existe une hétérogénéité dans les valeurs de la constante de Michaelis de l'invertase qui dépendent des conditions opératoires ainsi que de la source de l'enzyme. De ce fait, **Cherrak (2003)** a obtenu: $V_{\max} = 1640 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m = 0,081 \text{ mol.l}^{-1}$; **Alnajjar (2003)** a obtenu: $V_{\max} = 454 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m = 0,011 \text{ mol.l}^{-1}$

Conclusion

Ce travail est pour objectif d'étude des paramètres cinétique de l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae*.

La première phase de notre étude a consisté à extraire l'invertase, à partir d'une levure de boulangerie : *Saccharomyces cerevisiae*.

Nous avons ensuite mesuré l'activité de cette enzyme dans différentes conditions opératoires et nous avons en particulier opté pour l'utilisation du pH 4,6 tout au long de cette étude afin de maximiser cette activité.

L'étude de l'influence de la température sur l'activité de l'invertase extraite de *Saccharomyces cerevisiae* nous a permis de déterminer une température optimale de l'invertase de 60°C et d'estimer une énergie d'activation d'environ 34,32 KJ.mol⁻¹ de la réaction d'hydrolyse du saccharose par l'invertase.

Enfin, la courbe de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat a été décrite en utilisant les équations de Michaelis-Menten et de Lineweaver-Burk. Nous avons obtenu les paramètres cinétiques suivants : $V_{max} = 3333,33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ et $K_m = 0,033 \text{ mol.l}^{-1}$.

Afin de compléter et d'approfondir ce travail, nous proposons :

- ✓ L'extraction et la purification de l'invertase d'autres sources.
- ✓ L'utilisation de l'invertase purifiée afin d'avoir une activité standardisée pour des résultats fiables.
- ✓ L'immobilisation de l'invertase et l'étude de ses paramètres cinétiques.

*Références
bibliographiques*

- 1. Acosta, N; Beldarrain, A; Rodriguez, L; Alonso, Y.** Caracterisation of recombinant invertase expressed in methylotrophic yeasts.2000, *biotechnol. Appl. Biochem*, V 32, pp 179-187.
- 2. Alnajjar, A.** Préparation et études cinétique de la β -fructosidase de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) soluble et immobilisé. 2001, Mémoire en vue de l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie Moléculaire et Cellulaire, Université Aboubekr Belkaid - Tlemcen, p 86, 100.
- 3. Arruda, L. M. O; Vitolo, M.** Characterization of Invertase Entrapped into Calcium Alginate Beads. 1999, Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil, pp 23-33.
- 4. Augère, B; Baehr, J.C; Grandperrin, D; Perrier, C.** Biologie. 2006, *Dunod*, Paris, p 541.
- 5. Bacha, A.** Production et étude de l'activité de l'invertase produite par la levure *Saccharomyces cerevisiae* sur substrat à base de datte. 2008, mémoire pour l'obtention de diplom de magister en agronomie, Université EL Hadj Lakhdar - Batna, p 34.
- 6. Benzian, S.** Immobilisation de la β -fructosidase de *Saccharomyces cerevisiae* et étude des phénomènes de transfert de matière. 2003, Mémoire pour l'obtention du diplôme de magister en Biologie, Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen, p56.
- 7. Bourgeois, C.M; Larpent, J.** Microbiologie alimentaire. 1996, Vol II: Aliments fermentés et fermentation alimentaire, Ed Lavoisier, Paris, p 523.
- 8. Bousmaha, L; Ouhssine, M; El ychioui, M.** Isolement et caractérisation de *Candida guilliermondii* productrice d'une β fructofuranosidase endocellulaire.2014, laboratoire de biotechnologie microbienne, Université Ibn Tofail, Kénitra, Maroc, p 311-317.
- 9. Campbell, N; Reece, J.** Biologie. 2007, édition du renouveau pédagogique INC(7), p 187.

- 10.Chaplin, M.F; Bucke, C.** Enzyme technology. 1990, Cambridge university, p 33.
- 11.Cherrak, S.** Mise en œuvre de la β -fructosidase de *Saccharomyces Cerevisiae* dans un bioréacteur à lit fluidisé. 2003, Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Magister en Biologie, Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen, p 82.
- 12.Coutouly, G.** Génie enzymatique.1991, Paris, Doin et Masson, p 245.
- 13.Daniel, R.M; Danson, M.J.** Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. 2013, A century of Michaelis - Menten kinetics, Volume 587, Issue 17, pp. 2738–2743.
- 14.Dides, J; Fabre, P.** Etude du phénotype invertase de la Levure de bière, etude de l'activité de l'enzyme invertase, Fiche laboratoire. 2007, Stage TP SvT en lycée J. Moulin de Pézenas, p 1.
- 15.Geoffrey , M.C.** La cellule: Une approche moléculaire de Boeck Supérieur. 1999, Amazon France, p 12.
- 16.Gouzi, H.** Etude cinétique de l'hydrolyse du saccharose par la β -fructosidase (E.C.3.2.1.26) de levure soluble et immobilisée en gel d'alginate. Mémoire de D.E.S., Université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, p61.
- 17.Guiraud, J; Galzy, P.** Microbiologie alimentaire.1998, Ed. Dunod. Paris, p 615.
- 18.Haq, I; Baig, M.A; Sikander,A.** Effect of cultivation conditions on invertase production by hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* isolates. 2005, World Journal of Microbiology &Biotechnology, 21, pp. 487- 492.
- 19.Hennequin, C; Thierry, A; Richard, F; Lecointre, M; Nguyen, V; Gaillardin, j; Dujon, B.** Microsatellite Typing as a New Tool for Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Strains. 2001, journal of clinical microbiology, 2001, Vol. 39, No. 2, pp 551–559.

- 20.Hsaia, C.C; Fu, R.H; Sung, H.Y.** A novel bound form of plant invertase in rice suspension cells. 2002, Bot. Bull. Acad. Sin., 43, pp. 115-122.
- 21.Jaime, J.W.** Functional Profiling of the *Saccharomyces Cerevisiae* Genome in the Study of Mechanisms of Metal and Metalloid Toxicity. 2008, the Pennsylvania state university, p 219.
- 22.kader, J.C.** Thèse de doctorat en Sciences biologiques et fondamentales appliquées. 1990, Psychologie, Paris 6, p 96.
- 23.Kaiser, C.A; Botstein, D.** Secretion-Defective Mutations in the Signal Sequence for *Saccharomyces cerevisiae* Invertase. 1986, Molecular and cellular biology, p 2382-2391.
- 24.Kati, D.E.** Cours de génie enzymatique .2011-2012, Université de Béjaia – FSNV Département des Sciences Alimentaires, p 57.
- 25.Kamoun, P.** Appareils et méthodes en biochimie. Paris : Flammarion,Médecine - Sciences, 1997, p 222.
- 26.Kern, G; Kern, D; Jaenicke, R; Secider, R.** Kinetics of folding and association of differently glycosylated variants of - invertase from *Saccharomyces cerevisiae*.1993, *Protein Science*, 2, No 1, pp. 1862-1868.
- 27.Kulshrestha, S; Tyagi, P; Sindhi, V; Yadavilli, K.S.** Invertase and its applications. 2013, journal of pharmacy research, 7, pp. 792 -797.
- 28.Larpent, J. P.** Biotechnologie des levures.1991, *Ed. Masson*. Paris, p 426.
- 29.Larpent. J.P; gourgaud, M.L.** Eléments de microbiologie.1985, éditeurs des sciences et des arts, Herman, paris, p 46.
- 30.Leclerc, H; Meyer, A; Deiana J.** Cours de microbiologie générale. 1995, Nouveau programme. Biosciences et Techniques. doin éditeurs, Paris, p 8.
- 31.Lemerini,W.** Contribution à l'étude des paramètres cinétiques de l'ascorbate oxydase de courgette verte (*Cucurbita pepo medullosa*). Ebauche d'un capteur optique pour le dosage de l'acide ascorbique. 2006, Mémoire Pour

l'obtention du diplôme de Magistère en biologie, université Aboubekr Belkaid, Tlemcen, p 82.

- 32.Minifie, B.W.** Chocolate, cocoa, and confectionery. 1999, Science and technology third edition, p 433.
- 33.Mohandesi, N; Siadat, S.O.R; Haghbeen, K; Hesampour, A** .Cloning and expression of *Saccharomyces cerevisiae* SUC2 gene in yeast platform and characterization of recombinant enzyme biochemical properties. 2016, 3 *Biotech*, 6, p 129.
- 34.Mouranche, A; costes, C.** Enzymes d'intérêt industriel. 1985, Gauthier-villars-bordas, paris, pp. 14,40.
- 35.Murray, R.K; Granner, D.K; MAYES, P.A; Rodwell, V.W.** BIOCHIMIE DE HARPER.2003, 25 éditions américaines revues et mise à jour, traduite par Paul Cohen (Université Pierre et Marie Curie), p 213.
- 36.Naumoff D.G.** Conserved sequence motifs in levan sucrases and bifunctional β -xylosidases and α -L- arabinases.1999, F.E.B.S. Letters, 488, pp.177-179.
- 37.Pelmont, J.** Les enzymes. 1993, office des publications universitaires, pp. 167-169.
- 38.Persano Oddo, L; Piazza, M.G; Pulcini, P.** Invertase activity in honey 1. 1999, Istituto Sperimentale per la Zoologia Agraria, Sezione di Apicoltura, , Italy, 30 (1), pp. 57-65.
- 39.Purves , W.K; Orians, G.H; Heller, C.H.** Le monde du vivant.1994, édition française traduite de l'anglais et coordonnée par Jacqueline london professeur Université Denis Diderot, Paris-7, p511.
- 40.Reddy, A; Maley, F.** Studies on identifying the catalytic role of Glu-204 in the active site of yeast invertase.1996,The journal of Biological Chemistry, 271,No 24, pp. 13953-13958.

- 41.Reddy, A; Maley, F.** Identification of an active-site residue in yeast invertase by affinity labeling and site-directed mutagenesis.1990, *The Journal of Biological Chemistry*, 265, No 19, pp. 10817-10820.
- 42.Revuz, B.** Microbiologie et industrie alimentaire (culture de la levure sur m \hat{e} lasse).1979, (Ed) Lavoisier. Paris, pp.113-120.
- 43.Shankar,T; Thangamathi, P; Rama, R; Sivakumar, T.** Optimization of Invertase Production Using *Saccharomyces Cerevisiae* MK Under Varying Cultural Conditions. 2013. *International Journal of Biochemistry and Biophysics* 1(3), pp. 47-56.
- 44.Teixeira, M.C; Raposo, L.R; Mira, N.P; Lourenc, O.A.B; Sa Correia , I.** Genome-Wide Identification of *Saccharomyces cerevisiae* Genes Required for Maximal Tolerance to Ethanol.2009, *Applied and environmental microbiology*, Institute for Biotechnology and BioEngineering, Portugal, pp. 5761–5772.
- 45.Tortora, G.J; Funk, B.R; Case, C.L.** introduction à la microbiologie.2003, edition du renouveau pédagogique, Canada, p 121.
- 46.Tortora, G.J; Anagnostakos, N.P.** Principes d’anatomie et de physiologie.1987, Ed. INC, 5 ème édition, pp.688-693.
- 47.Voet, D; Voet, G, J.** BIOCHIMIE. 2004, authorized translation from English Language, edition published by John Wiley & Sons, Inc, p 28, 35.
- 48.Vorster, D.J; Botha, F.C.** Partial purification and characterization of sugarcane neutral invertase. 1998, *Phytochemistry*, 49, No 3, pp. 651-655.
- 49.Wallach, J.** Les enzymes. 1997, Nathan, Paris, pp 4, 6-8.
- 50.Wang N, S.** Experiment N14 : enzymes kinetics of invertase via at determination , protocole de travaux pratique.1996, université du Maryland, p 68.

Annexes

I. Préparation du tampon acéto-acétique

Pour préparer le tampon acéto-acétique 0,1M – Ph 4,6, utilisé comme solvant de l'invertase et de son substrat (saccharose), il faut procéder à la préparation des solutions suivantes :

- ✓ Solution « A » d'acide acétique 0,2 M : 11,55 ml de CH_3COOH dilués dans 1000 ml d'eau distillée.
- ✓ Solution « B » d'acétate de sodium 0,2M : 27,2g $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ dissous dans 1000 ml d'eau distillée.
- ✓ Mélanger 25,5 ml de la solution « A » et 24,5ml de la solution « B », compléter à 200 ml avec de l'eau distillée pour obtenir une solution tampon à 0,1M de pH 4,6.

II. Composition du réactif de biuret :

- **1g** du sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- **6g** du tartrate double de sodium et de potassium
- **30g** d'hydroxyde de sodium
- **1g** d'iodure de potassium (KI)
- **1000ml** d'eau distillée.

III. Préparation du réactif l'acide 3,5 - dinitrosalicylique (DNSA)

- ✓ Dissoudre 1g de DNSA dans 20 ml de soude 2 N.
- ✓ Ajouter une solution de 30 g de tartrate double de sodium et de potassium dissout dans 50 ml d'eau distillée.
- ✓ Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée et agiter jusqu'à obtention d'une solution homogène de couleur orange-rouge (si nécessaire, chauffer légèrement le mélange).

Le réactif DNSA doit être conservé dans un flacon bien fermé et à l'abri de la lumière.

Résumés

Résumé

L'objectif de notre travail était de mettre en évidence l'activité enzymatique et de déterminer les paramètres cinétiques de l'invertase (E.C. 3.2.1.26) extraite de *Saccharomyces cerevisiae*.

Notre travail consiste, dans un premier temps, d'obtenir une préparation brute de l'invertase de la levure de boulanger et d'étudier l'influence de quelques paramètres physico-chimiques sur l'activité de l'enzyme.

Nous avons constaté que l'activité enzymatique est maximale sur une gamme de pH allant de « 4,2 à 4,6 », avec un pic d'activité caractérisé par une activité comparable à pH= 4,6.

L'influence de la température sur la vitesse d'hydrolyse du saccharose par l'invertase a été étudiée dans un intervalle de température allant de 15°C à 80°C. L'activité maximale a été mesurée à 60°C. L'énergie d'activation de la réaction enzymatique d'hydrolyse de saccharose a été estimée à 34,32 K.J.mol⁻¹ dans l'intervalle de 15 à 60°C.

La cinétique enzymatique est mise en évidence à différentes concentrations en saccharose dans les conditions opératoires standards. Les paramètres cinétiques de Michaelis-Menten obtenus: $V_{max} = 3333,33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$, $K_m = 0,033 \text{ mol.l}^{-1}$.

Mots clés : *Saccharomyces cerevisiae*, extraction, invertase, activité enzymatique, paramètres cinétiques.

Summary

The objective of our work was to demonstrate the enzymatic activity and to determine the kinetic parameters of the invertase (E C.2.1.26) extracted from *Saccharomyces cerevisiae*.

Our work consisted first of all in obtaining a crude preparation of the invertase of the baker's yeast and to study the influence of some physicochemical parameters on the activity of this enzyme. .

We found that enzyme activity is maximal over a wide range of pH ranging from (4,2-4,6), with a peak activity characterized by activity comparable to pH = "4,6".

The influence of temperature on the rate of hydrolysis of sucrose *cerevisiae* by invertase was studied in the temperature range from 15 ° C to 80 ° C. The maximum activity was measured at 60 ° C. The activation energy of the enzymatic reaction of sucrose hydrolysis was estimated to be 34 k.j.mol⁻¹ in the range 15°C-60°C.

Enzymatic kinetics are demonstrated at different concentrations of sucrose under standard operating conditions. The kinetic parameters of Michaelis and Menten obtained:

$$V_{\max} = 3333,33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}, k_m = 0,033 \text{ mol.l}^{-1}$$

Keywords:

Saccharomyces cerevisiae, extraction, invertase, enzymatic activity, kinetic parameters.

ملخص

الهدف من عملنا هو إظهار النشاط الأنزيمي وتحديد الثوابت الآلية للإنفرتاز β - فريكتوزيداز (E C.2.1.26) من خميرة الخبز.

وكان عملنا في المقام الأول هو الحصول على المستخلص الخام للإنفرتاز من خميرة البيرة ودراسة تأثير بعض العوامل الفيزيائية والكيميائية على نشاط الإنزيم.

وجدنا أن نشاط الإنزيم هو أقصى مدى على نطاق واسع من درجة الحموضة تتراوح من (2،4-4،6)، وفي هذا النشاط هناك دورة النشاط التي تميز هذا النشاط للمقارنة. الحموضة المقابلة هي "4،6".

تمت دراسة تأثير درجة الحرارة على سرعة اماهة السكاروز بواسطة الانفرتاز ما بين 15 م° - 80 م°. تم قياس النشاط الأقصى عند 60 م° بلغت طاقة التنشيط 34،31 كج/مول لإماهة السكاروز بوجود الانفرتاز (ما بين 15 م° - 60 م°).

الثوابت الآلية تقاس في وجود تراكيز مختلفة للسكاروز مع احترام ظروف التشغيل القياسية.

الثوابت الآلية لمكليز ومنتن المحصل عليها هي:

$$V_{max} = 3333,33 \mu\text{mol.l}^{-1}.\text{min}^{-1}, \quad K_m = 0,033 \text{ mol.l}^{-1}$$

الكلمات المفتاحية: خميرة الخبز، استخراج، الانفرتاز، النشاط الإنزيمي، الثوابت الآلية.