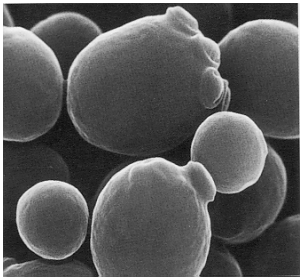


Etude du phénotype invertase de la Levure de bière

Etude de l'activité de l'enzyme invertase

Fiche laboratoire

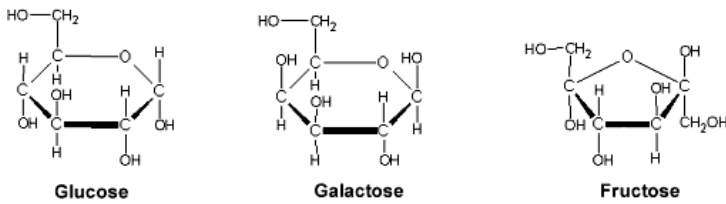


La levure de bière utilise généralement le saccharose de son milieu nutritif pour se développer. Afin d'assimiler ce nutriment, la levure produit une enzyme, la **saccharase** ou **invertase**, qui va hydrolyser le saccharose.

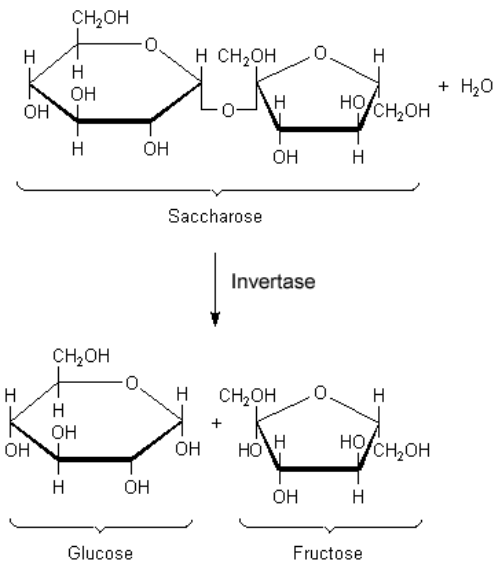
La souche sauvage de levure **SAC +** produit et exporte une invertase dans son milieu nutritif. La souche mutée **SAC -** n'exporte pas son invertase et ne se développe pas sur milieu où le saccharose est le seul sucre disponible.

Les sucres simples ou saccharides

Les monosaccharides ont pour formule générale $C_nH_{2n}O_n$ ($3 < n < 7$). Les plus communs ont 6 atomes de Carbone ($C_6H_{12}O_6$, $M=180$) et diffèrent par la disposition de leurs atomes :



L'assemblage de 2 monosaccharides forme un disaccharide tel que le saccharose ($C_{12}H_{22}O_{11}$, $M=342$). L'hydrolyse du saccharose libère ainsi un glucose et un fructose. Les disaccharides les plus communs sont le saccharose (glucose + fructose), le lactose (glucose + galactose), le maltose (glucose + glucose) ...



Matériel biologique de départ

Cultures de souches SAC + et SAC - de levures de bière, solution d'invertase

Eléments de protocole

Culture des levures en milieu liquide

Mettre en suspension une colonie de levure dans 200 mL de milieu complet liquide stérile.

Incuber 2 jours à 30°C : l'estimation du développement des levures s'effectue par numération cellulaire sous microscope.

Composition du milieu complet liquide : Peptone 10g + Extrait de levures 10g + Saccharide 20 g + 1 L E.D.

Culture des levures sur milieu gélosé

Mettre en suspension une colonie de levure et diluer de façon à obtenir une densité d'environ 1000 cellules/mL.

Ensemencer, par étalement, 0,1 mL de la suspension diluée, dans des boîtes de Pétri stériles, ou a été coulé un milieu complet solide.

Incuber 4 jours à 30°C : l'estimation du développement des levures s'effectue par comptage des colonies d'1 boîte.

Composition du milieu complet solide : Peptone 10g + Extrait de levures 10g + Agar 20 g + Saccharide 20 g + 1 L E.D.



Préparation d'un extrait enzymatique de levure

- Prélever 10 mL de suspension de levures dans un tube à centrifuger.
- Centrifuger les suspensions de levures, conserver le surnageant.

Ce surnageant constitue un extrait des enzymes extracellulaires produites et exportées par les levures

- Récupérer le culot en y ajoutant 2 mL de tampon phosphate pH 4,6. Agiter.
- Broyer soigneusement le culot dans un mortier avec un peu de sable de Fontainebleau.
- Ajouter 10 mL de tampon phosphate pH 4.6 et continuer à broyer.
- Centrifuger le broyat et récupérer le surnageant.

Ce surnageant constitue un extrait des enzymes intracellulaires produites par les levures

Préparation d'une solution enzymatique d'invertase pure

Dissoudre 25 mg d'invertase lyophilisée dans 50 mL tampon phosphate pH7.

Test de l'activité invertase d'un extrait enzymatique

Incuber, au bain-marie 30°C, 10 minutes, 1 mL d'extrait enzymatique avec 2 mL d'une solution de disaccharide 25 g.L⁻¹
Rechercher alors la présence de glucose pour vérifier l'hydrolyse du disaccharide et donc l'action de l'invertase ...

- **Utilisation de bandelette test glucose**
- **Utilisation possible de la réaction de Fehling**

Les saccharides ont, à l'exception du saccharose, des propriétés réductrices, utilisées pour leur mise en évidence. La recherche de sucres réducteurs permet de vérifier la transformation du saccharose en monosaccharide réducteur. Les sucres réducteurs réduisent la **liqueur de Fehling**, réactif coloré bleu, pour former un précipité rouge brique. La réaction s'effectue à chaud (3 min. au bain à sec 100°C).

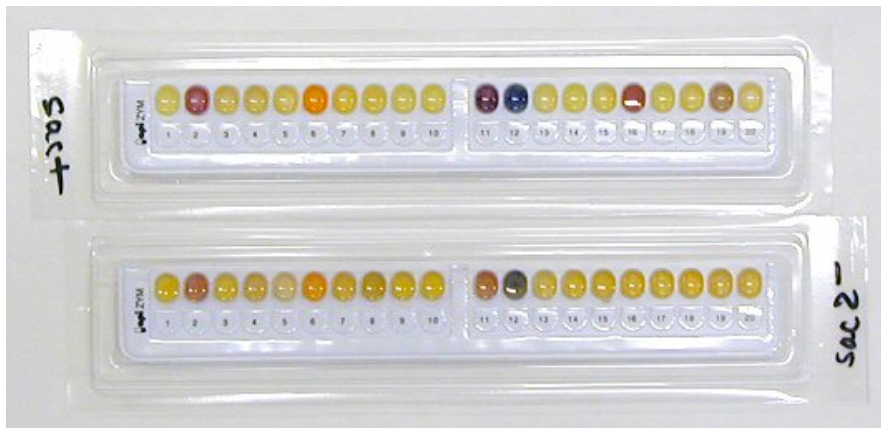
- **Utilisation d'une galerie API-ZYM®**

Les galeries API-ZYM permettent de révéler d'éventuelles activités enzymatiques dans le milieu de culture.

Chaque cupule de la galerie contient, au départ, le substrat et un réactif coloré d'une réaction enzymatique particulière.

On dépose, dans chaque cupule de la galerie, quelques gouttes de la suspension de levures à tester. Après 1 à 2 jours d'incubation à 35°C, une modification de la couleur (la couleur de départ est le jaune) révèle la présence et l'activité de l'enzyme recherchée.

Exemple de résultats :



1. Témoin sans substrat
2. Phosphatase alcaline
3. Estérase
4. Estérase lipase
5. Lipase
6. Leucine arylamidase
7. Valine arylamidase
8. Cystine arylamidase
9. Trypsine
10. Chymotrypsine
11. Phosphatase
12. Naphtol P-hydrolase
13. Alpha-galactosidase
14. Lactase
15. Hyaluronidase
16. Invertase (test 1)
17. Cellulase
18. Chitinase
19. Invertase (test 2)
20. Alpha-fucosidase

Matériel

Centrifugeuse, tubes à centrifuger
Etuve bactériologique
Bain marie et bain à sec, chauffage, pince bois

Poste de manipulation élève

porte tube, 8 tubes à essai Ø12mm, marqueur
pissette ED + cuvette
pince, ciseau
pipettes 1, 2 et 5 mL + pipeteurs
Mortier, pilon, sable de Fontainebleau, cuiller.

Poste de préparation des solutions

Balance, coupelle de pesée, spatule
Verrerie pour préparation des solutions (fiole jaugée, bécher, éprouvette graduée, flacons, pipettes)

Poste stérile de mise en culture

Chauffage, autoclave
Boîtes de Pétri, tubes de culture, étaleurs, pipettes

Poste de numération cellulaire

Microscope, pipette pasteur, cellules de numération

Réactifs

Souches de *Saccharomyces cerevisiae* (Sordalab)

Eau distillée stérile, Peptone, Extrait de levures, Agar

Saccharose, Maltose, Lactose, Fructose, Glucose

Invertase

Tampon phosphate pH 4,6 et pH 7

Liqueur de Fehling

Bandelettes test glucose

Galerie API et réactifs associés