

TP 4 : PRODUCTION D'UNE ENZYME MICROBIENNE

(EXEMPLE : AMYLASE BACTÉRIENNE)

1. Objectif du TP :

🎯 Produire une enzyme extracellulaire (amylase) à partir d'une souche bactérienne, optimiser les conditions de culture et mesurer l'activité enzymatique.

2. Matériel et Réactifs :

◆ *Micro-organisme :*

- Souche bactérienne productrice d'amylase (ex : **Bacillus subtilis**)

◆ *Milieu de culture :*

- Milieu d'induction de production :
 - Peptone : 5 g/L
 - Extrait de levure : 5 g/L
 - Amidon soluble : 10 g/L
 - NaCl : 5 g/L
 - pH ajusté à 7.0

◆ *Autres réactifs :*

- Lugol (solution d'iode)
- Acétate de sodium (0,2 M, pH 5)
- DNS (3,5-dinitrosalicylique) pour dosage des sucres réducteurs
- Standard de glucose

◆ *Matériel :*

- Autoclave
- Agitateur incubateur
- Centrifugeuse
- Spectrophotomètre
- Bain-marie
- Tubes à essai, micropipettes, béchers

3. Protocole expérimental

1. Préparation du préinoculum

- Inoculer un tube de gélose nutritive avec la souche de *Bacillus subtilis*
- Incuber 24h à 37 °C

2. Préparation du milieu de production

- Préparer 100 mL du milieu dans un erlenmeyer de 250 mL
- Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes

3. Inoculation et incubation

- Inoculer le milieu avec 1 mL de la culture bactérienne
- Incuber à 37 °C, **pendant 24 à 48h** sous agitation (150 rpm)

4. Récupération du surnageant enzymatique

- Centrifuger à 6000 rpm pendant 10 minutes
- Récupérer le surnageant contenant l'amylase extracellulaire

4. Dosage de l'activité enzymatique (méthode DNS)

◆ Réaction enzymatique :

- Mélanger :
 - 0,5 mL d'enzyme (surnageant)
 - 0,5 mL de solution d'amidon (1%)
 - Incuber 10 minutes à 37 °C

◆ Révélation :

- Ajouter 1 mL de réactif DNS
- Chauffer au bain-marie (5 min à 95 °C)
- Refroidir, puis lire l'absorbance à 540 nm

◆ Calcul :

- Utiliser une courbe standard de glucose pour déterminer l'activité enzymatique (U/mL). Parce que **La quantité de couleur (absorbance) est proportionnelle à la concentration en glucose.**
Mais pour convertir cette absorbance en mg/mL de glucose, **il faut une référence : c'est le rôle de la courbe standard.**

Comment la préparer ?

- **Préparer plusieurs solutions de glucose de concentrations connues** (par exemple : 0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 ; 1 mg/mL)
- **Pour chaque solution :**
 - Prendre 0,5 mL de solution de glucose
 - Ajouter 1 mL de réactif DNS
 - Chauffer 5 min à 95 °C
 - Refroidir et mesurer l'absorbance à 540 nm

Tracer un graphe :

- **Axe X** : concentration en glucose (mg/mL)
- **Axe Y** : absorbance à 540 nm

► On obtient une **droite** (loi de Beer-Lambert) : $\text{Absorbance} = a \times [\text{Glucose}] + b$

a : elle représente la **variation de l'absorbance** par unité de concentration de glucose (mg/mL). C'est la **sensibilité** du dosage. C'est à dire : Pour chaque augmentation de **1 mg/mL** de glucose, l'absorbance augmente par une **valeur constante a**

b : c'est l'absorbance mesurée **lorsque la concentration en glucose est nulle**. En théorie, elle devrait être proche de zéro, mais en pratique, elle reflète les **bruits de fond ou impuretés**.

Après avoir réalisé la réaction enzymatique entre l'enzyme et l'amidon :

1. Le mélange produit du glucose.
2. On mesure l'absorbance après ajout du DNS.
3. À l'aide de la courbe standard, on détermine la **concentration de glucose libéré**.
4. Cette quantité permet de calculer l'**activité enzymatique** :

1 Unité enzymatique (U) = quantité d'enzyme qui libère **1 μmol de glucose par minute** dans les conditions données.

5. Exploitation pédagogique

- Comparer l'activité enzymatique selon le temps d'incubation ou le pH du milieu.
- Interpréter les résultats et comprendre le lien entre **conditions de culture** et **rendement enzymatique**.
- Notion de **biotechnologie microbienne** : valorisation des bactéries industrielles.

6. Remarques importantes

- Ce protocole est adaptable pour d'autres enzymes comme : protéases (caséine), lipases (huile d'olive), cellulases (carboxyméthylcellulose).
- Peut faire l'objet d'un mini-projet de 2 séances de TP:
 - **Séance 1 : Production**
 - **Séance 2 : Dosage enzymatique**