



■ Matériel

- Comprimé d'amylase
- Empois d'amidon à $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Solution d'eau iodée
- Compte-goutte
- Fiole jaugée 50 mL
- Pilon et mortier
- Cuve de spectroscopie
- Interface EXAO avec turbidimètre ou colorimètre

■ Préparation

Solution enzymatique

- Broyer le comprimé d'amylase à l'aide du pilon et du mortier.

(Remarque : si l'on souhaite vérifier la présence de sucres réducteurs en fin de réaction, il est plus rigoureux d'enlever la pellicule enrobant les comprimés. Pour l'étude décrite ici, ce n'est pas nécessaire).

- Placer la poudre obtenue dans la fiole jaugée et rajouter de l'eau QSP 50 mL.
- Agiter jusqu'à dissolution complète.

Coloration de l'empois d'amidon

- En fonction de la qualité de l'eau iodée, les dosages pourront être différents. Il faut noter que si la concentration en eau iodée est trop importante la réaction enzymatique est inhibée.
- De bons résultats ont été obtenus ici en ajoutant quelques gouttes d'eau iodée (2 à 5) dans un bécher de 250 mL d'empois d'amidon à $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- La couleur finale obtenue doit être un bleu marine transparent. Si la solution est opaque, la concentration en iode inhibe la réaction.

Calibrage du colorimètre

- L'absorbance maximale de l'amidon est obtenue pour des longueurs d'onde proches du rouge.
- Le maximum d'absorbance (100 %) est réglé en utilisant la solution d'amidon préalablement préparée.
- Le « blanc » (0 % d'absorbance) est réglé en utilisant une solution dans laquelle la réaction entre amylase et amidon s'est déjà produite depuis plusieurs minutes (5-10 min.) dans les conditions expérimentales décrites ci-dessous. Une cuve contenant une telle solution peut avoir été préparée à l'avance.

Configuration de l'acquisition

La durée d'acquisition doit être de 5 minutes ou plus. Les unités sont à configurer en fonction du matériel utilisé. Par exemple, si le colorimètre est branché sur l'entrée ligne de l'interface ExAO, il délivre une tension comprise entre -1 et +1V. Les unités devront être modifiées pour être exprimées en Absorbance.

■ Manipulation

Remarque : la vitesse de la catalyse enzymatique est maximale au tout début de la manipulation. On doit donc commencer la mesure dès que le mélange entre la solution d'enzyme et de substrat est réalisé. Pour cela, le plus commode est d'utiliser l'ajout des solutions comme acteur du mélange. Les mesures réalisées dans le manuel ont été obtenues de la façon suivante :

- 10 gouttes de la solution enzymatique ajoutées dans la cuve de spectroscopie.
- Solution d'empois d'amidon colorée versée jusqu'au trait de mesure ou tout repère identifiable sur la cuve. La grande quantité d'empois d'amidon par rapport à celle d'enzyme assure l'homogénéité du mélange.
- La cuve est immédiatement transférée dans le colorimètre et l'acquisition est aussitôt démarrée.

Ce protocole peut être décliné en modifiant le pH de la solution de substrat avant ajout (pour tester l'influence des conditions environnementales), la nature de l'enzyme (pour tester la spécificité enzymatique), la concentration en enzymes ou bien la concentration en substrat.

Pour une mesure de la digestion enzymatique de l'albumine (présentée p. 170), la longueur d'onde doit être ajustée sur les colorimètres vers une lumière bleue.