

Thème 5 – Chapitre 3 – Activité 5

INFLUENCE DE L'AUTOCLAVAGE SUR LES GLUCIDES CONTENUS DANS LES MILIEUX DE CULTURE

Eléments de réponse



1. PRINCIPE DU DOSAGE DU SACCHAROSE PAR UN KIT ENZYMATIQUE

1.1.

Le saccharose est hydrolysé en glucose et en fructose. Le glucose est ensuite converti en glucose 6P. Enfin, la transformation du glucose6P permet la formation de NADPH,H⁺. Ce dernier composé absorbe, il peut être dosé par spectrophotométrie.

$$n_{\text{saccharose}} = n_{\text{glucose}} = n_{\text{glucose6P}} = n_{\text{NADPH,H+formé}}$$

1.2.

À 340 nm, l'absorbance est maximale pour le NADPH,H⁺ et le NADP⁺ n'absorbe pas à cette longueur d'onde.

1.3.

Le nom usuel de la première enzyme est la saccharase car elle hydrolyse le saccharose.

1.4.

Enzyme	Classe	Justification
Saccharase	Hydrolase	Cette enzyme hydrolyse le saccharose.
Hexokinase	Transférase	Cette enzyme transfère un groupement phosphate de l'ATP au glucose ou au fructose.
Glucose 6P déshydrogénase	Oxydo-réductase	Cette enzyme transfert des électrons et des protons du glucose6P au NADP ⁺ .

1.5.

Le premier chiffre du numéro de code indique la classe à laquelle appartient l'enzyme. Le 3 correspond à la classe des hydrolases. L'enzyme 3.2.1.26 est donc la saccharase.

1.6.

La réaction principale est celle dont le substrat est la molécule à doser : réaction catalysée par la saccharase.

La réaction indicatrice fait apparaître un produit qui absorbe : réaction catalysée par la déshydrogénase.

Les réactions auxiliaires correspondent aux autres réactions mises en jeu au cours du dosage : réactions catalysées par l'héxokinase.

1.7.

Une enzyme est spécifique du substrat sur lequel elle agit. Le lactose ne devrait pas fausser les résultats du dosage.

1.8.1.

Cas 1	Cas 2	Cas 3
Le saccharose reste intact lors de l'autoclavage	Le saccharose est hydrolysé en glucose+ fructose	Le saccharose est totalement dégradé
Il y a production de NADPH,H ⁺ : lors du dosage le saccharose est transformé en glucose puis en glucose6P et il y a production de NADPH,H ⁺ par la déshydrogénase.	Il y a production de NADPH,H ⁺ : Lors du dosage, le glucose présent dans le milieu est transformé en Glucose6P et il y a donc production de NADPH,H ⁺ par la déshydrogénase.	Il n'y a pas de production de NADPH,H ⁺ car le saccharose, le fructose et le glucose ont été totalement dégradés par l'autoclavage.

1.8.2.

Il est nécessaire de doser spécifiquement le glucose libre dans le milieu après autoclavage sinon il est impossible de distinguer les cas 1 et 2 présentés précédemment.

2. MODE OPÉRATOIRE DU DOSAGE DU SACCHAROSE

2.1.

Le réactif 2 contient l'ensemble des éléments nécessaires pour que les réactions enzymatiques s'effectuent sauf le NADP+ (réactif 1) :

- les enzymes :
 - . saccharase
 - . hexokinase
 - . glucose6P déshydrogénase
- ATP
- tampon

2.2.

Le temps doit être suffisamment long car il faut que les réactions soient toutes terminées (dosage en point final).

2.3.

La température influence la vitesse des réactions enzymatiques. Une diminution de la température entraîne une diminution de la vitesse de catalyse. Il est donc nécessaire d'augmenter le temps d'incubation.

2.4.1.

Dans le bouillon M17, il y a 5 g de saccharose pour 1 L de milieu. La concentration en saccharose sera de 0,5 g.L⁻¹ dans ce milieu dilué au 1/10. Cette dilution est donc correcte puisque la concentration obtenue se situe bien entre 0,05 et 0,8 g.L⁻¹.

2.4.2.

Pour effectuer le dosage, il est nécessaire d'avoir 0,1 mL d'échantillon. On peut donc préparer 500 µL de milieu dilué ainsi :

- 50 µL de milieu ;
- 450 µL d'eau.

2.5.

Un témoin permettant de prendre en compte la couleur de l'échantillon pourrait être réalisé ainsi :

- 2,42 mL d'eau physiologique ;
- 0,1 mL de milieu à doser.

3. ANALYSE DES RÉSULTATS

3.1.

La concentration en saccharose pour l'étalon est connue, elle est égale à $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ donc

$$C_{\text{essai}} = \frac{\Delta A_{\text{essai}}}{\Delta A_{\text{étalon}}} \times C_{\text{étalon}}$$

	Avant autoclavage			Après autoclavage		
	E1	E2	E3	E'1	E'2	E'3
C (g.L^{-1})	0,500	0,505	0,496	0,527	0,558	0,493

3.2.

Pour chaque milieu, trois essais ont été effectués donc $3,3 \times Sr = 0,066 \text{ g.L}^{-1}$

- essais avant autoclavage :

$$C_{\text{max}} - C_{\text{min}} = 0,505 - 0,496 = 0,009 \text{ g.L}^{-1} \leq 3,3 \times Sr$$

Les résultats ont donc bien été obtenus en condition de répétabilité donc :

$$C_{\text{avant autoclavage}} = \frac{C_{E1} + C_{E2} + C_{E3}}{3} = 0,500 \text{ g.L}^{-1}$$

- essais après autoclavage :

$$C_{\text{max}} - C_{\text{min}} = 0,558 - 0,493 = 0,065 \text{ g.L}^{-1} \leq 3,3 \times Sr$$

Les résultats ont donc bien été obtenus en condition de répétabilité donc :

$$C_{\text{après autoclavage}} = \frac{C_{E'1} + C_{E'2} + C_{E'3}}{3} = 0,526 \text{ g.L}^{-1}$$

3.3.

Pour réaliser les essais, les milieux ont été dilués au $1/10^{\circ}$, il est donc nécessaire de multiplier les résultats obtenus précédemment par 10.

De plus, l'incertitude élargie (U) est égale à $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, on obtient donc :

$$C_{\text{avant autoclavage}} = (5,0 \pm 0,4) \text{ g.L}^{-1} \text{ et } C_{\text{après autoclavage}} = (5,3 \pm 0,4) \text{ g.L}^{-1}$$

3.4.

Compte-tenu de l'incertitude sur les résultats obtenus, les concentrations avant et après autoclavage ne sont pas significativement différentes. La technique d'autoclavage utilisée n'a pas modifié la concentration en saccharose dans le milieu de culture.