

## **T.P. n° 2 : Détermination de la vitesse initiale d'une réaction enzymatique**

### **Principe :**

Pour mesurer la vitesse initiale, on opère en présence d'enzyme et de substrat à concentration constante, en milieu tamponnée pH = 4,7 et thermostaté à 37°C. On fait varier le temps de contact entre substrat et enzyme et on mesure la concentration du produit formé (sucres invertis).

### **Matériel :**

- ✓ Tubes à essai et portoir ;
- ✓ Pipettes et micropipette ;
- ✓ Pipeteurs ;
- ✓ Eprouvette ;
- ✓ Béchers ;
- ✓ Balance ;
- ✓ Verre de montre et spatule ;
- ✓ Agitateur et barreau magnétique ;
- ✓ Étuve réglée à 37°C ;
- ✓ Bain-marie bouillant ;
- ✓ Agitateur vortex ;
- ✓ Spectrophotomètre et cuves ;

### **Réactifs :**

- ✓ Extrait enzymatique dilué (1/100) ;
- ✓ Tampon acétate 0,05M à pH 4,7 ;
- ✓ Solution de saccharose à 0,1 M ;
- ✓ Réactif au DNS ;

### **Mode opératoire :**

- ✓ Préparer les tubes selon le tableau ci-dessous :

<b>N° de tube</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
Solution de saccharose 0,1M (ml)				1		
Eau distillée (ml)				1		
Tampon acétate pH 4,7 (ml)				1		
Préincubation (min)				5 min à 37 °C		

Extrait enzymatique dilué (1/100) (ml)	0	0,1				
Temps de contact (min)	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>15</b>
Réactif au DNS (ml)	2					
Incubation	Homogénéiser, boucher les tubes avec du papier aluminium et porter <b>5 min</b> au bain marie bouillant. Laisser refroidir puis ajouter :					
Eau distillée (ml)	6					

- ✓ Homogénéiser et laisser reposer 10 min à température ambiante.
- ✓ Lire les absorbances (DO) à 540 nm contre le blanc (tube 0).

**Travail à faire :**

- ✓ Tracer la courbe  $DO = f(t)$
- ✓ Tracer la courbe  $[\text{sucre invertis}] = f(t)$
- ✓ Calculer la vitesse initiale de la réaction ( $V_i$ ) en  $\mu\text{mol de saccharose hydrolysé} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (L = litre de milieu réactionnel)).