

T.P. n°3 : Étude de la cinétique enzymatique de l'invertase (Km et Vmax)

Principe :

La détermination de la vitesse initiale de la réaction catalysée par l'invertase est réalisée en présence d'enzyme et de substrat à concentration constante, à pH 4,7 et à température de 37-40°C. Le temps de contact entre l'enzyme et le substrat est variable.

Les paramètres cinétiques de l'invertase (Km et Vmax) sont mesurés en faisant varier la concentration en substrat.

Matériel :

- ✓ Tubes à essai ;
- ✓ Pipettes et micropipette ;
- ✓ Eprouvette ;
- ✓ Becher ;
- ✓ Balance de précision ;
- ✓ Étuve réglée à 37°C ;
- ✓ Bain-marie bouillant ;
- ✓ Agitateur vortex ;
- ✓ Agitateur et barreau magnétiques
- ✓ 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 ;
- ✓ Eau distillée.

Mode opératoire :

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

N° de tube	0	1	2	3	4
Solution de saccharose 0,1M (ml)	0	0,1	0,2	0,5	1
Eau distillée (ml)	2	1,8	1,7	1,4	0,9
Tampon acétate pH 4,7 (ml)	1				
Préincubation	5 min à 37°C				

Extrait enzymatique dilué (1/100) (ml)	0	0,1
Temps de contact	Agiter et incuber à 37°C pendant : 1, 3, 5 et 10 min	
Réactif au DNS (ml)	2	
Incubation	✓ Homogénéiser, boucher les tubes avec du papier aluminium et porter 5 min au bain marie bouillant. ✓ Laisser refroidir puis ajouter :	
Eau distillée (ml)	6	

N.B. : pour chaque volume de saccharose, il faut préparer une série de 5 tubes (un tube blanc 0 et 4 tubes dans quels la réaction est arrêtée après 1, 3, 5 et 10 minutes respectivement).

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

Travail à faire :

- ✓ Pour chaque concentration de saccharose, calculer la vitesse initiale (V_i) à partir de la courbe [sucre inverti] = $f(t)$ et à l'aide de la courbe d'étalonnage (du T.P. précédent). L'unité de la V_i est $\mu\text{mol/L/min}$.
- ✓ Calculer les valeurs de $[S]_0$ pour chacune des expériences.
- ✓ Tracer la courbe $V_i = f([S]_0)$ et $1/V_i = f(1/[S]_0)$.
- ✓ Déterminer K_m et V_{max} .