

T.P. n°4 : Étude de l'effet de pH sur l'invertase

Principe :

On mesure la vitesse initiale de la réaction en présence d'enzyme et de substrat à concentration constante, en milieu thermostaté à 37°C. On fait varier le pH du milieu réactionnel.

Matériel :

- ✓ Tubes à essai ;
- ✓ Pipettes et micropipette ;
- ✓ Étuve réglée à 37°C ;
- ✓ Bain-marie bouillant ;
- ✓ Agitateur vortex ;
- ✓ Spectrophotomètre et cuves ;
- ✓ Papier aluminium.

Réactifs :

- ✓ Extrait enzymatique dilué (1/100) ;
- ✓ Tampon acétate à différents pH ;
- ✓ Solution de saccharose à 0,1 M ;
- ✓ Réactif au DNS ;
- ✓ Eau distillée.

Mode opératoire :

En fait, ce TP nécessite la préparation des solutions tampons ayant des pH allant de 2,5 à 7,5. Le mode opératoire consiste à préparer deux (2) tubes pour chaque pH ; un tube blanc (B) et l'autre tube pour l'essai (E) comme l'indique le tableau ci-dessous :

pH du tampon	2,5		4		4,7		6		7,5	
	B	E	B	E	B	E	B	E	B	E
Eau distillée (ml)	1	0,9	1	0,9	1	0,9	1	0,9	1	0,9
Saccharose 0,1 M (ml)	1									
Tampon (ml)	1									
	Préincuber les tubes pendant 5 minutes à 37 °C									
Extrait enzymatique dilué (ml)	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1

Temps de contact	Agiter et incuber à 37°C pendant : 1, 3, 5 et 10 min
Réactif au DNS (ml)	2
	Homogénéiser, boucher les tubes avec du papier aluminium et porter au bain marie bouillant pendant 5 minutes . Laisser refroidir
Eau distillée (ml)	6

N. B. : pour chaque valeur de pH il faut préparer une série de 5 tubes (un tube blanc **B** et 4 tubes **E** dans lesquels 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 B).

Travail à faire :

- ✓ A l'aide de la courbe d'étalonnage réalisée précédemment, calculer les valeurs de la vitesse (V_i) pour chaque expérience (en $\mu\text{M/L/min}$).
- ✓ Tracer la courbe $V_i = f(\text{pH})$.
- ✓ Interpréter le résultat obtenu.