

T.P. n°5 : Effet de la température sur l'invertase

Principe :

On mesure la vitesse initiale de la réaction en présence d'enzyme et de substrat à concentration constante, en milieu tamponné pH = 4,7. On fait varier la température du milieu réactionnel.

Matériels :

- ✓ Bains-marie ;
- ✓ Spectrophotomètre UV-visibles + cuves ;
- ✓ Etuve réglée à 40°C ;
- ✓ Tubes à essai ;
- ✓ Bêchers ;
- ✓ Eprouvette ;
- ✓ Pipette et micropipette ;
- ✓ Plaques chauffantes ;
- ✓ Agitateur Vortex ;
- ✓ Thermomètre.

Réactifs :

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

Mode opératoire :

On préparer cinq tubes à essai pour chaque condition de température comme suit :

Condition de température	1		2		3		4		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									
Température d'incubation (10 min)	0° C		Température de laboratoire		40° C		60° C		90° C	
Extrait enzymatique	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1

Temps de contact	Agiter et incuber 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 température 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 $V_i = f(T^\circ)$.
- ✓ Interpréter les résultats obtenus.