

TP n°3 : Influence de la concentration en substrat sur l'activité enzymatique

Les enzymes sont des biocatalyseurs, c'est-à-dire qu'ils réalisent des réactions chimiques transformant une molécule initiale (le substrat) en une autre molécule (le produit).

La présence d'un site actif spécifique d'un substrat, au niveau de l'enzyme est responsable de sa fonction catalytique.

➤ Objectif de connaissance :

- On cherche à montrer l'influence de la concentration en substrat sur la cinétique enzymatique, c'est-à-dire l'étude de la vitesse de réaction enzymatique en fonction de certains facteurs.

➤ Objectifs méthodologiques :

- Réaliser une manipulation d'après un protocole
- Réaliser des schémas
- Adopter une démarche explicative

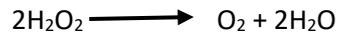
➤ Travail à réaliser :

- Réalisez la manipulation proposée et interprétez vos résultats.
- L'animation qui se trouve dans le logiciel Lactase 2 montre un modèle de déroulement d'une réaction enzymatique :
 - Réalisez une série de schémas représentant les étapes observables de cette réaction telle quelle est montrée dans l'animation.
 - Montrez en quoi ce modèle est conforté par les résultats de vos mesures.
 - Expliquez pourquoi la vitesse de la réaction n'augmente plus au-delà d'une certaine concentration en substrat.

Productions attendues	Critères de réussites
Réalisation de la manipulation.	Respect des consignes, utilisation maîtrisée du matériel, rangement.
Détermination de la vitesse maximale de réaction pour chaque concentration de substrat.	Détermination correcte des pentes maximale de chaque courbe.
Tableau des résultats et graphique de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat.	Tableau complet et graphique complet et titré.
Paragraphe argumenté.	Interprétation de la courbe obtenue.
Réalisation des schémas.	Schémas grands, propre, complet avec titre et légendes.
Paragraphe argumenté.	Exploitation des résultats afin de répondre au problème.

Document : Protocole expérimental permettant de déterminer l'influence de la concentration en substrat

L'enzyme utilisée sera la catalase, une enzyme présente chez beaucoup de végétaux et qui catalyse la décomposition de l'eau oxygénée (H_2O_2) produites lors des oxydations cellulaires :



On peut mettre en évidence l'activité de cette enzyme par mesure de la concentration en O_2 du milieu dans lequel elle est placée (par EXAO).

1. Préparation du substrat :

L'eau oxygénée du commerce est titrée à 10 volumes. A partir de ce produit préparez dans différents tubes : 10 ml de solution à 5V, 2,5V et 1V.

2. Paramétrage des mesures :

Allumer la console Labquest et brancher la sonde à dioxygène.

Choisir une durée de 180 s et une fréquence de 1 mesure/seconde

3. Mesures :

- ✓ Mettre 10 ml d'eau dans la cuve du bioréacteur.
- ✓ Ajouter 1 ml de catalase.
- ✓ Mettre le barreau magnétique, le couvercle et lancer l'agitation.
- ✓ Mettre la sonde en place.
- ✓ Déclencher la mesure.
- ✓ Au bout de 30 secondes, introduire 1 ml d'eau oxygénée à 1V. Laisser la mesure se terminer.
- ✓ Effectuer les mêmes mesures avec les autres solutions d' H_2O_2 par ordre croissant de concentration.
- ✓ Quand vous lancer une mesure la console Labquest vous demande ce que vous voulez faire de la dernière série de mesures. Choisissez « Stocker ». La mesure démarre au moment où vous cliquez sur l'option « stocker ».
- ✓ Entre chaque mesure rincer soigneusement le réacteur et la sonde.

4. Traitement des mesures :

- ✓ Récupérez les données sur le logiciel Logger Pro, compléter le graphique et l'intégrer au compte rendu.
- ✓ Déterminez la pente maximale de chaque courbe, correspondant à la vitesse maximale de réaction, exprimée en microles d' O_2 par litre et par minute.
- ✓ Reporter dans un tableau les valeurs de vitesse maximale en fonction de la concentration en substrat et construire le graphique correspondant.
- ✓ Interprétez la courbe ainsi obtenue.