

Université de Bejaia
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de biologie physico-chimique



3^{ème} année Licence de Biochimie
Matière : Enzymologie

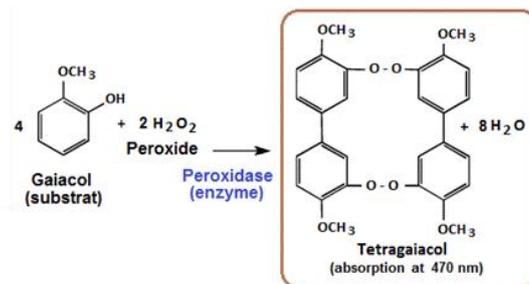
TP2 : CINETIQUE DE LA PEROXYDASE DU NAVET

I. Objectif

Détermination des paramètres cinétique de la peroxydase du navet

II. Principe

La vitesse de la réaction catalysée par la peroxydase de la peroxydation du gaïacol (incolore) en tétragaïacol (produit coloré) est mesurée par le suivi de la formation du produit par méthode spectrophotométrique.



III. Matériel et Réactifs

Solution Gaïacol 2⁰/₀₀
Solution Peroxyde d'hydrogène 0,3%
Tampon phosphate pH 6,5
Solution carbonate de sodium 1M
Tubes à essai
Micropipettes 1000 et 100
Cuves pour spectrophotomètre
Spectrophotomètre visible

IV. Méthodes

IV.1. Effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse

Dans 5 tubes à essai mélanger 1 ml de gaïacol (2‰) et 1mL de H₂O₂ (0.3%) puis ajouter l'extrait d'enzyme dilué à différents volumes (0, 100, 200, 300 et 400µl) et compléter à 2,5 ml le volume totale pour chaque tube par le tampon. Laisser incuber à température ambiante pendant 10min. Arrêter la réaction par ajout de 300 µl de carbonate de sodium 1M dans chaque tube et Mesurer l'absorbance à 470 nm (**tableau I**).

IV.2. Effet de la concentration de H₂O₂

Dans 5 tubes à essai mélanger 1 ml de gaïacol (2‰) avec différents volumes de H₂O₂ (0.3%) (0, 200, 400, 600 et 1000µl) puis 100µl de l'extrait d'enzyme dilué et compléter à 2,5 ml le volume totale pour chaque tube par le tampon. Laisser incuber à température ambiante pendant 10min. Arrêter la réaction par ajout de 300 µl de carbonate de sodium 1M dans chaque tube et Mesurer l'absorbance à 470 nm (**tableau II**).

IV.3. Effet de la concentration du gaïacol

Dans 5 tubes à essai mélanger différents volumes (0, 200, 400, 600 et 1000µl) de solution de gaïacol à 2‰ avec 1ml de H₂O₂ (0.3%) compléter à 2,4 ml le volume totale pour chaque tube par le tampon puis ajouter 100µl de l'extrait d'enzyme dilué. Laisser incuber à température ambiante pendant 10min. Arrêter la réaction par ajout de 300 µl de carbonate de sodium 1M dans chaque tube et Mesurer l'absorbance à 470 nm (**tableau III**).

V. Résultats et interprétation

Déterminer :

1. Les vitesses de la réaction enzymatique
2. Tracer les courbes correspondantes
3. Interpréter le résultat de l'effet de la concentration de l'enzyme sur la vitesse de la réaction
4. Interpréter le résultat de l'effet de la concentration de l'H₂O₂ sur la vitesse de la réaction
5. Interpréter le résultat de l'effet de la concentration de du gaïacol sur la vitesse de la réaction
6. Déterminer les paramètres cinétiques V_{max}, K_m_{gaiacol}, K_m_{H2O2}

EQUATIONS ET FORMULES

✚ Vitesse $V = \Delta[\text{produit}] / \text{temps} = \Delta\text{abs}_{450\text{nm}} / \text{temps (min)}$

✚ Equation de Michaelis :

$$v = \frac{v_{max} [S]}{k_m + [S]}$$

✚ Equation de Lineweaver-Burck :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{v_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_m}$$

TABLEAU I

	Tube 0	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
H ₂ O ₂ 0.3% (ml)	1	1	1	1	1
Gaïacol 2 ⁰ / ₀₀ (ml)	1	1	1	1	1
Eau (µl)	1	400	300	200	100
Extrait enzymatique dilué au 1/10 (µl)	0	100	200	300	400
Incubation pendant 10 min à température ambiante					
Solution carbonate de sodium 1M (µl)	300	300	300	300	300
Mesure Abs à 470 nm					

TABLEAU II

	Tube 0	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
H ₂ O ₂ 0.3% (µl)	0	200	400	600	1000
Gaïacol 2 ⁰ / ₀₀ (ml)	1	1	1	1	1
Eau (µl)	1400	1200	1000	800	400
Extrait enzymatique dilué au 1/10 (µl)	100	100	100	100	100
Incubation pendant 10 min à température ambiante					
Solution carbonate de sodium 1M (µl)	300	300	300	300	300
Mesure Abs à 470 nm					

TABLEAU III

	Tube 0	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
H ₂ O ₂ 0.3% (ml)	0	1	1	1	1
Gaïacol 2 ⁰ / ₀₀ (µl)	1	200	400	600	1000
Eau (µl)	1400	1200	1000	800	400
Extrait enzymatique dilué au 1/10 (µl)	100	100	100	100	100
Incubation pendant 10 min à température ambiante					
Solution carbonate de sodium 1M (µl)	300	300	300	300	300
Mesure Abs à 470 nm					