

TP13 : Les conditions d'action d'une enzyme

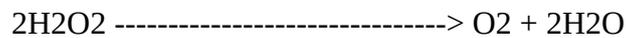
Au sein des cellules, les réactions biochimiques sont catalysées par des enzymes. Ces enzymes agissent sous certaines conditions. Elles agissent en petites quantités et se retrouvent inchangées à la fin de la réaction. On cherche à comprendre les mécanismes de la catalyse enzymatique.

- Problématique : [Qu'est-ce qui conditionne la vitesse de la catalyse enzymatique ?](#)
- Hypothèses :

[Le pH, la température, la concentration en substrat ou la concentration en enzyme influencent l'activité catalytique des enzymes.](#)

Remarque : l'enzyme agissant à très faible concentration, il serait difficile de tester la 4^{ème} hypothèse. Dans ce TP, nous testerons donc la température, le pH et la concentration en substrat.

- **Principe expérimental** : Nous utilisons une enzyme extraite du navet, la catalase qui catalyse la décomposition de l'eau oxygénée (toxique pour les organismes) produite au cours des oxydations cellulaires selon la réaction suivante.



- **Conséquence vérifiable** :

[La vitesse d'apparition de l'O₂ traduit l'activité de l'enzyme sur son substrat \(l'eau oxygénée\).](#)

- **Utilisation d'une chaîne d'expérimentation assistée par ordinateur (EXAO) :**



Préparation du logiciel :

- 1- Ouvrez l'atelier scientifique sur le bureau
- 2- Sélectionnez « Enzymo » puis « Etude de cinétique enzymatique par oxymétrie »
- 3- Cliquez sur l'onglet « graphique » en bas puis sur l'icône « acquisition » en haut à droite
- 4- Glissez l'oxymètre sur l'axe Y puis le chronomètre sur l'axe X
- 5- Choisissez une durée d'acquisition de 2 minutes
- 6- Cliquez sur l'onglet « Acquisition » : vous êtes prêts pour lancer l'acquisition !

Afin de se répartir le travail, chaque binôme choisira l'une ou l'autre des hypothèses. Les résultats seront sauvegardés dans le dossier SVT et imprimés pour l'ensemble de la classe. Leur exploitation en revanche sera individuelle et fera l'objet d'une évaluation.

Protocole pour tester l'effet de la concentration en substrat sur la vitesse de la réaction enzymatique

Cuve 1 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 0.25V

Cuve 2 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 0.5V

Cuve 3 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 1V

Cuve 4 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 2.5V

Cuve 5 = 1mL de catalase diluée + 5mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Identifiez les paramètres constants et le paramètre variable dans cette expérience :

Paramètres constants	Température, pH, concentration en enzyme
Paramètre variable	Concentration en substrat (H ₂ O ₂)

Préparez différentes dilutions à partir de la solution mère de 3% H₂O₂ (=10V) :

Tube1 --> 0.25V soit 0.25mL de H₂O₂ à 3% + 9.75mL d'eau

Tube2 --> 0.5V soit 0.5mL de H₂O₂ à 3% + 9.5mL d'eau

Tube3 --> 1V soit 1mL de H₂O₂ à 3% + 9mL d'eau

Tube4 --> 2.5V soit 2.5mL de H₂O₂ à 3% + 7.5mL d'eau

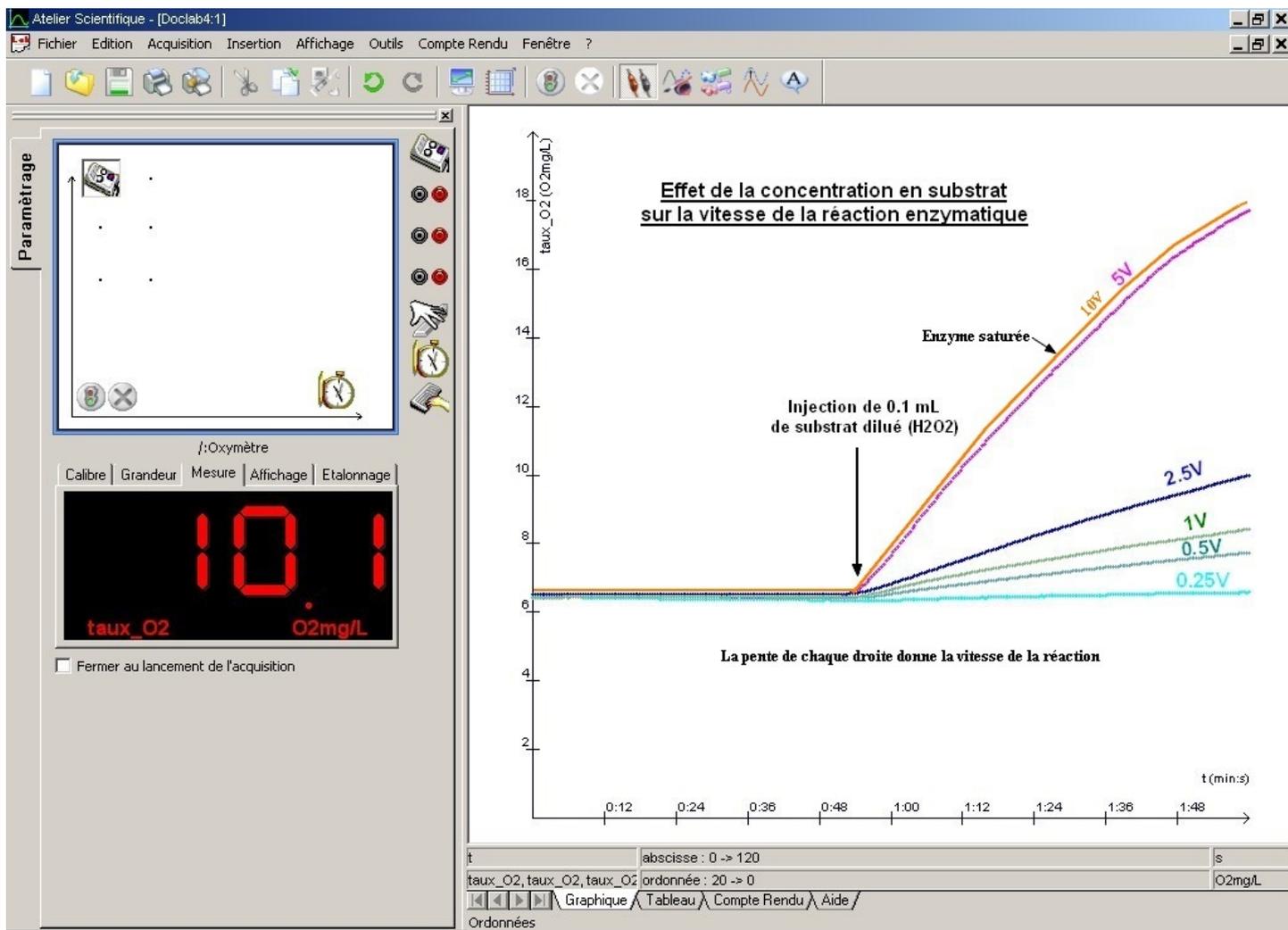
Tube5 --> 5V soit 5mL de H₂O₂ à 3% + 5mL d'eau

Suivez rigoureusement les étapes du protocole :

- 1- Introduisez dans la cuve 1mL de catalase diluée (extraite du navet) et rajoutez 5mL d'eau à 18°C
- 2- Rajoutez l'aimant et réglez l'agitation au minimum
- 3- Fermez l'enceinte et retirez tous les bouchons
- 4- Introduisez la sonde à O₂ réglée sur 6mg/L environ
- 5- Attendez quelques secondes que la valeur affichée se stabilise

- 6- Prélevez doucement 0.1mL de substrat avec la seringue munie du cathéter dans le tube 1
- 7- Lancez une acquisition (le logiciel vous propose de renommer la courbe, faites-le)
- 8- Introduisez le contenu de la seringue vers 30s de mesure puis attendez la fin de la mesure
- 9- Retirez la sonde et trempez-la dans son verre à pied puis lavez soigneusement la cuve, l'aimant (attention de ne pas le faire tomber dans le siphon de l'évier : utilisez la passoire !) et le couvercle.
- 10- Répétez ces opérations pour chaque concentration testée. Pour conserver la courbe précédente, il suffit de cliquer sur « Acquisition » sans fermer le document, le logiciel vous proposera une nouvelle manipulation.

Résultats :



Protocole pour tester l'effet de la température sur la vitesse de la réaction enzymatique

- Cuve 1 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 25°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V
- Cuve 2 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V
- Cuve 3 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 17°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V
- Cuve 4 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 7°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V
- Cuve 5 = 1mL de catalase diluée bouillie + 5mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V

Cuve 6 = 1mL de catalase diluée décongelée + 5mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H₂O₂ à 5V

Identifiez les paramètres constants et le paramètre variable dans cette expérience :

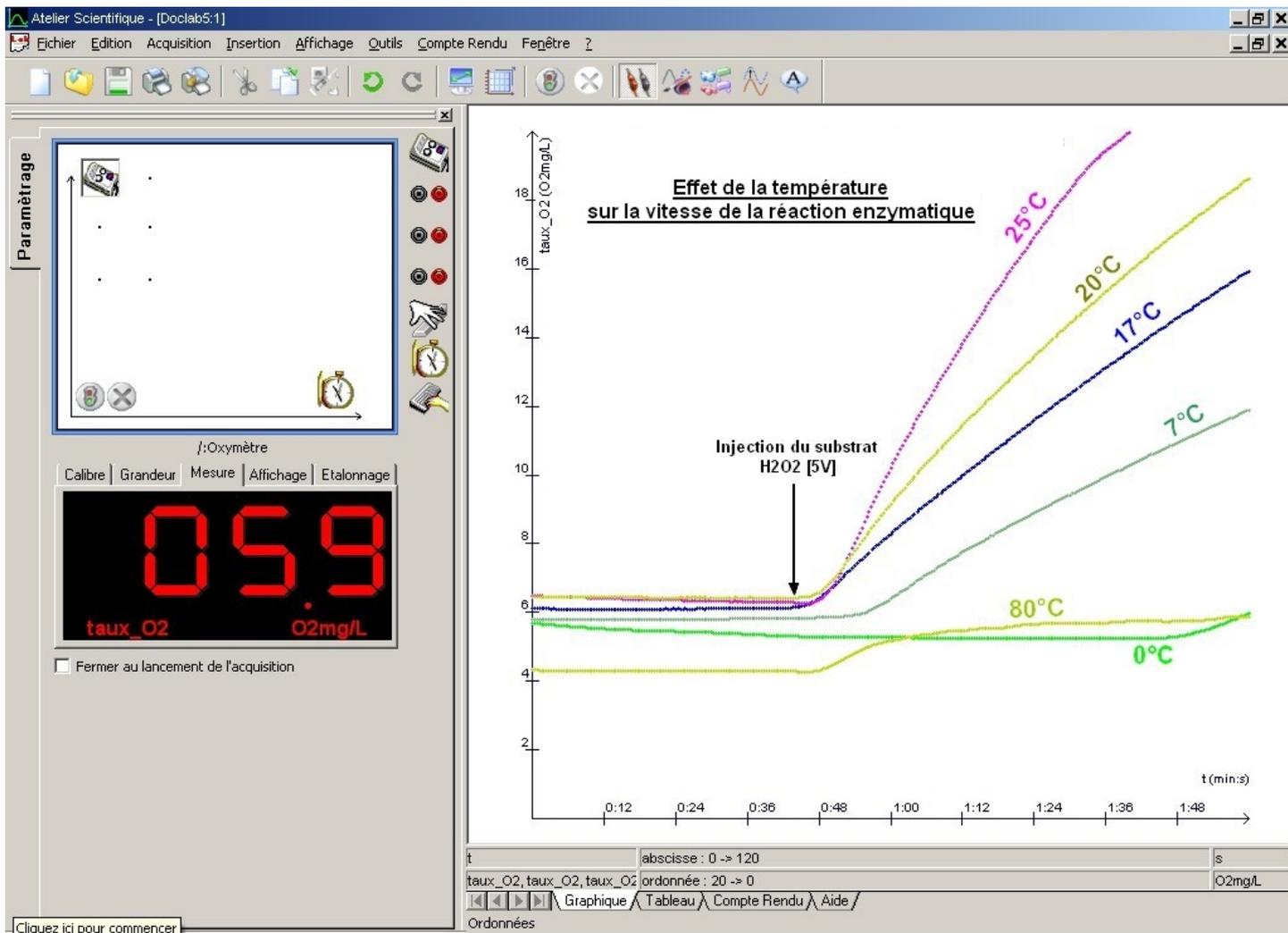
Paramètres constants	Concentration en substrat (H ₂ O ₂), pH, concentration en enzyme
Paramètre variable	Température

Suivez rigoureusement les étapes du protocole

- 1- Introduisez dans la cuve 1mL de catalase diluée (extraite du navet) et rajoutez 5mL d'eau à la température souhaitée
- 2- Rajoutez l'aimant et réglez l'agitation au minimum
- 3- Fermez l'enceinte et retirez tous les bouchons
- 4- Introduisez la sonde à O₂ réglée sur 6mg/L environ
- 5- Attendez quelques secondes que la valeur affichée se stabilise
- 6- Prélevez doucement 0.1mL de substrat avec la seringue munie du cathéter dans le tube 5 d'un groupe qui a déjà fait la dilution pour gagner du temps et économiser l'eau oxygénée
- 7- Lancez une acquisition (le logiciel vous propose de renommer la courbe, faites-le)
- 8- Introduisez le contenu de la seringue vers 30s de mesure puis attendez la fin de la mesure
- 9- Retirez la sonde et trempez-la dans son verre à pied puis lavez soigneusement la cuve, l'aimant (attention de ne pas le faire tomber dans le siphon de l'évier : utilisez la passoire !) et le couvercle.
- 10- Répétez ces opérations pour chaque température testée. Pour conserver la courbe précédente, il suffit de cliquer sur Acquisition sans fermer le document, le logiciel vous proposera une nouvelle manipulation.

Conseils : Pour faire varier la température, utilisez le chauffe-plat et la glace pilée : l'eau du robinet sort entre 15 et 17°C (à vérifier !). Ne traînez pas pour faire votre manipulation car la température varie très vite compte tenu du faible volume de la cuve. Pour avoir 0°C, versez de la glace pilée directement dans la cuve et attendez juste le moment où elle est complètement fondue pour lancer l'acquisition. Un réajustement de la valeur d'O₂ indiquée par la sonde s'avère souvent nécessaire car elle est très sensible à la température. Attendez un peu que la mesure soit stabilisée avant de lancer une acquisition...mais pas trop pour garder la même température !

Résultats :



Protocole pour tester l'effet du pH sur la vitesse de la réaction enzymatique

- Cuve 1 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 1 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V
- Cuve 2 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 3 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V
- Cuve 3 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 7 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V
- Cuve 4 = 1mL de catalase diluée + 5 mL d'eau à 20°C, pH 10 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V
- Cuve 5 = 1mL de catalase diluée + 5mL d'eau à 20°C, pH 12 / Seringue 1 = 0.1mL de H2O2 à 5V

Identifiez les paramètres constants et le paramètre variable dans cette expérience :

Paramètres constants	Température, concentration en substrat (H2O2), concentration en enzyme
Paramètre variable	pH

Suivez rigoureusement les étapes du protocole :

- 1- Introduisez dans la cuve 1mL de catalase diluée (extraite du navet) et rajoutez 5mL d'eau à 18°C au pH souhaité
- 2- Rajoutez l'aimant et réglez l'agitation au minimum
- 3- Fermez l'enceinte et retirez tous les bouchons
- 4- Introduisez la sonde à O2 réglée sur 6mg/L environ

5- Attendez quelques secondes que la valeur affichée se stabilise

6- Prélevez doucement 0.1mL de substrat avec la seringue munie du cathéter dans le tube 5 d'un groupe qui a déjà fait la dilution pour gagner du temps et économiser l'eau oxygénée

7- Lancez une acquisition (le logiciel vous propose de renommer la courbe, faites-le)

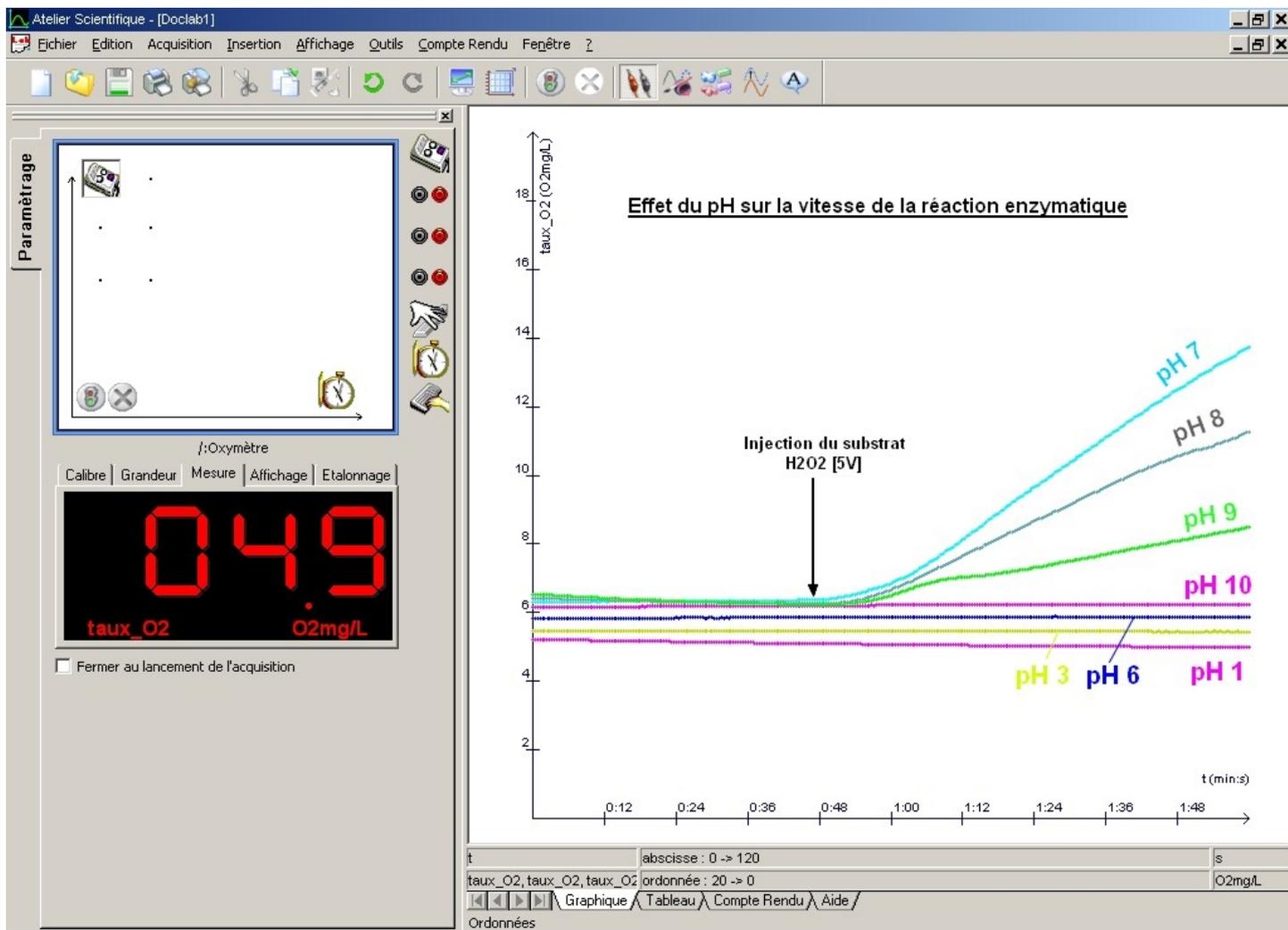
8- Introduisez le contenu de la seringue vers 30s de mesure puis attendez la fin de la mesure

9- Retirez la sonde et trempez-la dans son verre à pied puis lavez soigneusement la cuve, l'aimant (attention de ne pas le faire tomber dans le siphon de l'évier : utilisez la passoire !) et le couvercle.

10- Répétez ces opérations pour chaque pH testé. Pour conserver la courbe précédente, il suffit de cliquer sur Acquisition sans fermer le document, le logiciel vous proposera une nouvelle manipulation.

Conseil : Pour faire varier le pH, vous utiliserez les flacons de soude (base forte) et d'acide chlorhydrique (acide fort). Allez-y goutte par goutte car les solutions sont concentrées. SOYEZ PRUDENTS !

Résultats :



- Exploitation des résultats (à rendre sur feuille) :

1- Calculez les pentes de chaque courbe qui correspondent à la vitesse d'apparition du dioxygène, donc à la vitesse de réaction.