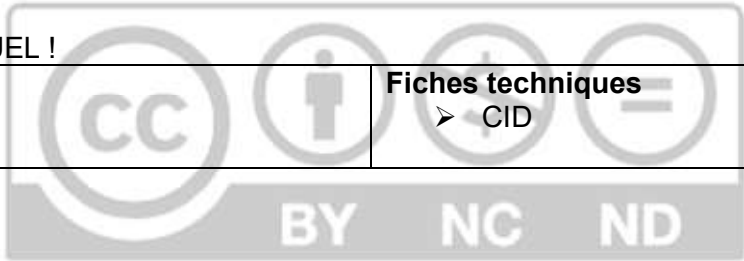




2019	Séquence – C
TP – 07	Doser un composé non-coloré 5



<p>Introduction</p> <p>Nous avons réussi à mettre en évidence une enzyme dans une solution, de façon qualitative. Néanmoins, nous n'avons pas réalisé un dosage précis de la quantité d'enzyme dans la solution. La plupart des normes alimentaires, sanitaires, ou encore les médicaments, précisent une quantité d'enzyme, non pas en masse ou en mole, mais en équivalent d'activité. Ceci pourrait se traduire par : la quantité d'enzyme suffisante pour transformer une quantité définie de substrat en produit, dans un laps de temps donné. Ceci s'appelle l'activité enzymatique (voir CD01).</p>	
<p>Problématique <i>Comment mesurer l'activité d'une enzyme ?</i></p>	
<p>Objectifs méthodologiques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Méthode point-final ; • Loi de Beer-Lambert. 	<p>Connaissances</p> <ul style="list-style-type: none"> • Dosage enzymatique par colorimétrie ; • Activité enzymatique.
<p>Points de vigilance</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gestion du temps ! • Gestion des déchets. 	<p>Livrables – Evaluation</p> <ul style="list-style-type: none"> • Compte-rendu écrit complet et individuel.
<p>Organisation du travail</p> <p>➤ TRAVAIL INDIVIDUEL !</p>	
<p>Documentation</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Document 01 ➤ Document 02 	<p>Fiches techniques</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ CID



Consigne 1 – Principe du dosage

1. **Utiliser** le document 01 pour compléter la CID ;
2. **Citer** les substrats de l'enzyme ;

Consigne 2 – Sécurité

Produit	Pictogramme	Mentions de danger	Conseils de prudence
Peroxyde d'hydrogène 		H312, H418	P280 P305+P351+P338+P310
Autres produits : <ul style="list-style-type: none">• Gaïacol : aucun danger connu ;• Tampon phosphate pH = 6.8 : aucun danger connu ;• Extraits enzymatiques = aucun danger connu.			

3. **Réaliser** l'analyse de risque correspondante à l'utilisation du peroxyde d'hydrogène ;
4. **Utiliser** l'organigramme des déchets pour déterminer le code du bidon de déchet ;

Consigne 3 – Dosage de l'activité enzymatique de la peroxydase

Tubes	T	E
Tampon phosphate, pH = 6.8	2.8	2.6
Gaïacol à 19.8 mmol/L	0.1	0.1
H ₂ O ₂ à 90 mmol/L	0.1	0.1
<u>Juste avant de lancer l'analyse,</u> <u>et après avoir fait le blanc réactif !</u> Extrait enzymatique dilué au 1/...	0	0.2
	Boucher la cuve avec du parafilm et retourner la cuve pour mélanger l'ensemble ! Abs @470nm après 120 secondes exactement, contre T (👉📖)	

Consigne 4 – Effets du pH et de la température sur l'activité de la peroxydase

5. **Proposer** un protocole permettant de tester l'effet de la température ou du pH sur l'activité de la peroxydase ;
6. **Mettre en œuvre** le protocole sélectionné, selon les consignes du document 02 (ne pas prendre en compte l'indication « S = ») ;

Refaire le blanc avec les nouvelles solutions !

Consigne 5 – Effets de la concentration en substrat

7. **Proposer** un protocole permettant de tester l'effet de la concentration en substrat sur l'activité de l'enzyme ;
8. **Mettre en œuvre** le protocole sélectionné, selon les consignes du document 02 : « S = » ;

Refaire le blanc avec les nouvelles solutions !

Consigne 6 – Exploitation des résultats

9. **Utiliser** une loi pour démontrer que la vitesse de l'enzyme, en concentration de produit formé par unité de temps est égale à :

$$v = \left(\frac{\Delta Abs(tétragaïacol)}{\Delta t} \right) \times \frac{1}{\epsilon \times \ell} \times (Fd(enzyme))$$

$$\epsilon(tétragaïacol, \lambda = 470 \text{ nm}, \text{pH} = 6,8) = 2,66 \cdot 10^4 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$$

10. **Montrer** que la vitesse s'exprime en mol/(L·s), sachant que le temps est en s ;
11. **Compléter** le tableau suivant :

Tube	E	pH ou Temp	S
Abs@470 nm			
C(tétragaïacol ; cuve) à t = 120 sec (μmol/L)			
V _{peroxydase} (μmol/(L·seconde))			
n(tétragaïacol ; cuve) à t = 120 sec (μmol)			
Activité _{peroxydase} (μmol/min)			
Rendement : (Activité _{peroxydase} X) / (Activité _{peroxydase} E)			

12. **Commenter** les résultats obtenus.