

II / Etude du système E/S :

A) Effet de la concentration du substrat et paramètres cinétiques.

Méthodes et Matériels :

Spectrophotométrie pour effectuer les mesures d'absorbance.

Tubes à hémolyse pour préparer les solutions.

Bain thermostaté à 30°C pour que la réaction se réalise dans son milieu.

La solution enzymatique composée de β -Galactosidase.

La solution tampon composée de phosphate notamment.

Le substrat de la réaction est l'ONPG.

La solution d'arrêt de la réaction est le carbonate de sodium.

On prépare 10 tubes à hémolyse de la façon suivante :

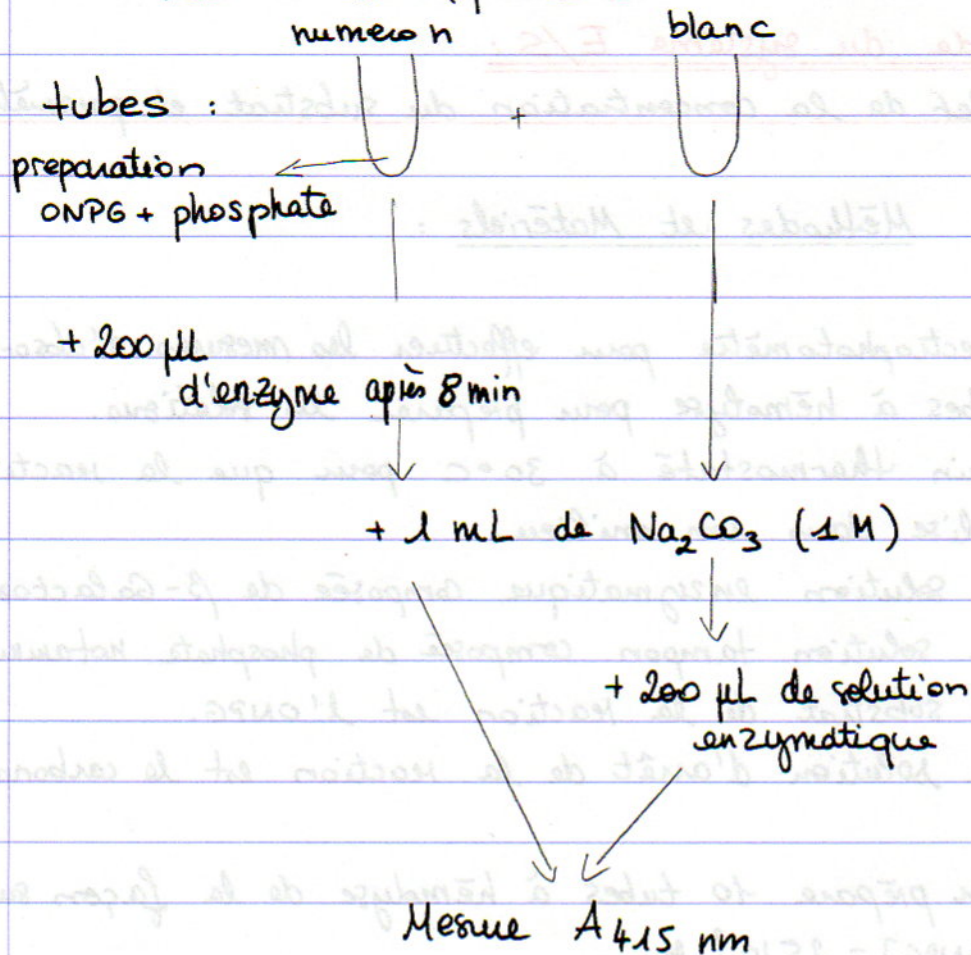
$$[\text{ONPG}] = 2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M.}$$

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ONPG (mL)	0,3	0,6	0,8	1,1	1,4	1,6	1,9	2,2	2,4	2,7
Phosphate (mL)	2,5	2,2	2	1,7	1,4	1,2	0,9	0,6	0,4	0,1
Abs.	0,482	0,686	0,743	1,104	1,369	1,529	1,977	2,303	2,291	3,236

On préchauffe ces 10 tubes au bain thermostaté à 30°C pendant 5 minutes, puis on déclenche la réaction en insérant 900 μL de solution enzymatique. Enfin, après le temps d'incubation (3 minutes), on stoppe la réaction avec 1 mL de Na_2CO_3 et on procède à la mesure de l'absorbance.

Le blanc utilisé est composé de tampon phosphate et de solution enzymatique ajoutée après le réactif d'arrêt pour que la réaction enzymatique ne se produise pas.

Schéma de l'expérience :



Résultats :

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$[ONPG]$ $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$	2,68	5,36	7,14	9,82	12,5	14,3	17	19,6	21,4	24,1
V_i $(10^{-4} \text{ mol.L}^{-1} \cdot \text{min})$	1,2	2,6	3,57	4,87	6,25	7,14	8,52	9,7	10,6	13,4

Pour déterminer la concentration en substrat du milieu :

$$[S]_f = \frac{[S]_{ini} \times 2,5 \cdot 10^{-3}}{2,8 \cdot 10^{-3}}$$

De ces données, on trace la représentation directe de Michaelis $v_i = f([S])$. On rappelle v_i est obtenue en calculant la pente de chaque courbe sur le graphique représentant $[ONPG]$ en fonction du temps ($v_i = -\frac{d[S]}{dt}$)

TP 2: ETUDE DE LA β -GALACTOSIDASE

II) A. (suite)

On rappelle l'équation de Michaelis : $v_i = \frac{V_{\max} \times [\text{ONPG}]}{K_m + [\text{ONPG}]}$ (1)

Il est indispensable de linéariser cette représentation pour en sortir les constantes cinétiques et pour cela on part de l'équation (1) :

Linearisation de Lineweaver et Burk :

$$v_i = \frac{V_{\max} \times [\text{ONPG}]}{K_m + [\text{ONPG}]}$$

$$\frac{1}{v_i} = \frac{K_m + [\text{ONPG}]}{V_{\max} \times [\text{ONPG}]} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[\text{ONPG}]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

On trace donc la courbe $\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[\text{ONPG}]}\right)$.

INTERPRETATIONS DES RESULTATS :

- On remarque que la concentration en substrat augmente en fonction du temps et que l'augmentation est plus forte sur les 3 derniers tubes où l'on a introduit plus de 2 mL d'ONPG.
- L'augmentation de la vitesse initial de la réaction et de la concentration d'ONPG semble être proportionnelles, la courbe obtenue aurait du présenter une asymptote en 0. Le temps d'analyse est peut-être trop court pour observer un quelconque plateau où la vitesse maximal aurait été atteinte.
- Sur le graphique $\frac{1}{v_i} = f\left(\frac{1}{[\text{ONPG}]}\right)$ sont reportés les différentes données v_i utiles pour déterminer V_{\max} et K_m .
On obtient : $V_{\max} = 1,345 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (courbe n°)
 $\frac{1}{V_{\max}} = \frac{1}{1,345 \cdot 10^{-3}} = 743,49 \text{ min} \cdot \text{M}^{-1}$
Sur la courbe n° , on obtient ainsi $K_m = 1,37 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

Par la linéarisation Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{V_{\max}} \approx 400 \text{ M} \cdot \text{min}^{-1} \quad \frac{1}{K_m} = 720 \text{ M}.$$

$$\Rightarrow V_{\max} = 2,50 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$\Rightarrow K_m = 1,38 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1}$$

On remarque que les valeurs obtenues sont proches pour K_m ($1,37 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$ et $1,38 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$). Or il y a une marge d'erreur pour la valeur V_{\max} . Mais il semblerait que la linéarisation soit une méthode plus précise pour déterminer les constantes V_{\max} et K_m .

B) Détermination de l'effet de la concentration du catalyseur.

La vitesse initiale d'une réaction enzymatique est la vitesse mesurée avant qu'une quantité suffisante de produit permette à la réaction inverse d'avoir lieu.

1) Nous voulons étudier l'effet de la concentration du catalyseur sur la réaction enzymatique ;

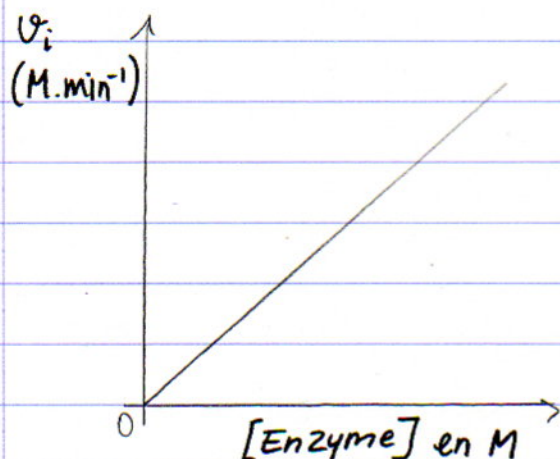
Mode opératoire :

- Préparer une série de 5 tubes à hémolyse contenant respectivement les volumes de solutions enzymatiques : 0,1 mL ; 0,2 mL ; 0,3 mL ; 0,4 mL à 15 U/mL.
- Compléter jusqu'à 2,5 mL de solution avec le tampon phosphate pH 7,3.
- Puis de minute en minute, ajouter 0,5 mL du substrat ONPG $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.
- Au bout du temps d'incubation de 3 minutes arrêter la réaction dans le tube n°1, puis de min. en min. dans les tubes suivants avec 1 mL de Na_2CO_3 .
- Préparer le tube témoin composé de substrat (0,5 mL) et de tampon phosphate (2 mL).
- Mesurer l'absorbance, tracer la cinétique $A_{415} = f(\text{temps})$

TP 2 : LA β -GALACTOSIDASE

II) B. Effet de la concentration du catalyseur.

- La vitesse initiale est toujours proportionnelle à la concentration d'enzyme. Ainsi la courbe $v_i = f([E])$ est une droite :



Lorsque la concentration de l'enzyme augmente, la vitesse initiale est accélérée.

2) L'activité spécifique de la préparation enzymatique:

AS : Quantité de produit (μmoles) par minute et par unité de masse de protéine.

C'est une mesure du degré de pureté de l'enzyme. Sa valeur augmente au cours de la purification et atteint une valeur maximale quand l'enzyme est pure.

$$AS = \frac{n(\text{ONP})}{\text{tps} \cdot [E]}$$

3) Constante catalytique k_{cat} :

Cette constante représente le nombre de cycles qu'une enzyme peut faire par unité de temps, c'est une activité spécifique moléculaire.

$$k_{cat} = \frac{v_{max}}{m_E} \quad \text{Il nous manque les données permettant le calcul du nombre de mole d'enzyme.}$$