Relation entre concentration en substrat et activité enzymatique. Ce TP est réalisé avec de la saccharase et permet d'aboutir à la notion de saturation de l'enzyme.

**PROBLEMATIQUE :**quelle est la cinétique d'une enzyme lorsque la concentration de celle-ci reste contante alors que la concentration en substrat augmente ?

**PROTOCOLE EXPERIMENTAL**

 Préparez 5 tubes à essais dans lesquels vous déposez 1 ml d’extrait de saccharase et respectivement  10 ml de solution de saccharose à 2g /l ; 5g/l ; 10g/l ; 20g/l ; 40g/l.  Placez les tous dans un bain-marie à 37°C.

**

*1.      Rappelez comment se mesure l’activité d’une enzyme. Dans ce TP, précisez quel est le nom du substrat, le nom de l’enzyme.*

*2.      Indiquez quel serait le témoin de cette expérience.*

*3.      Evaluez la quantité de glucose formé dans chacun des tubes à l’aide des bandelettes réactives et remplissez le tableau des résultats.*

**RESULTATS**

|  |  |
| --- | --- |
|   |                                       Temps en minutes. |
| Concentration initiale en saccharose |              5 |            15 |             25    |             35 |
|                                 Concentration en glucose ( g /l ). |  |
|        2 g /l |   |   |   |    |
|        5 g /l |    |   |   |   |
|       10 g /l |    |   |   |   |
|       20 g /l |    |   |   |   |
|       40 g /l |    |   |   |   |

 *4.      A partir de votre tableau de résultats, ( exprimé en g/l/min ), tracez une courbe représentant l’évolution de l’activité enzymatique en fonction de la concentration en saccharose. Vos calculs se feront sur les 5 premières minutes, c’est-à-dire sur la vitesse initiale.*

*5.     Interprétez vos résultats et concluez en répondant à la problématique.*

J'utilise Mégamylase (vendu en pharma,pas cher) 1 cachet/ 400ml ED
(idée piochée sur site:www.chez.com/bbenard,idée de G.Pineau) et que j'ai arrangée.
Ce médicament ne contient pas de sucres réducteurs(lactose entre autre) alors que Maxilase en contient,il faut enlever la pellicule orange en le passant ss l'eau, le broyer ds un mortier, diluer ds 400ml ED, et filtrer.(tester l'enzyme au labo si TP sur +sieurs jours car se dégrade)
Amidon 6g/l je le fait cuire(pas +de 2mn) au bain-marie (ballon ds une casserole sur plaque chauffante) pour éviter qu'il ne se dégrade en sucre. Le tester(sans **amylase**) au labo avec Liq. Fel. , si degradé ou trop cuit on a des surprises.
Par tube: 10ml d'amidon et 2 ml d'**amylase**
10ml d'amidon +2ml d'eau
10ml d'eau +2 ml d'**amylase**
Faire tests T0 avec lugol et liqueur de Felhing.
Incuber 20mn au bain-marie et refaire tests. ET CA MARCHE.
Pour test liq. Felhing j'utilise bain-marie bouillant pdt 2mn; ATTENTION amidon s'hydrolyse à haute T° dc limiter temps dc adapter à son propre matos.
Pour faire tests lugol j'utilise plaque avec puits (fournisseurs habituels) et des pipettes Pasteur en plastique.
Chaque binôme a donc: 2 tubes de 10ml d'amidon( identifiés Aet B),1 tube de 10ml d'eau:C, 2tubes d'**amylase** de 2ml identifiés S et S', 1 tube de 2ml d'eau E +6 pipettes Pasteur.
et un tube A', B', C' vides pour faire tests liq.Felh. au T0
EX: Dans le tube A je verse S bouche et mélange par retournement je prends pipette je place environ 1ml ds le puits(tests lugol) et je transvase 3ml ds A' auquel j'ajoute Liq.Felh. et qui va tt de suite au bain-marie bouillant pdt 2 mn ,le reste du tubeA est placé au bain-marie pdt 20mn...(la pipette usagée placée à part)
Après 20mn je prends autre pipette ,mets env.1ml ds puits(lugol) et met Liq.Felh. ds A et placé au bain-marie bouillant pdt 2 mn.
Faire B et C de même façon.
Pour éviter les mélanges de tubes de chaque binôme au bain-marie en plus des lettres sur tubes je mets leur N° de paillasse
ALORS BON COURAGE les préparateurs ne vont pas s'ennuyer je sais ce que c'est.  ( je numérote tout et place produits ds tubes adéquats)
Pour ceux qui utilisent bandelettes de glucose il faut + de temps ou alors mettre 3ml d'**amylase**.
J'ai testé aussi avec pancréatine **concentration** et volume différents.

Depuis longtemps, au Labo, nous utilisons la Maxilase 3000 en comprimé enrobé et cela "marche". Par contre nous avons essayé et aussitôt abandonné le sirop qui contient des glucides réducteurs.

Le protocole est le même que celui de Robin pour enlever la pellicule mais la dose est de 1cp pour 100 mL d'eau.
Pour l'empois d'amidon, c'est à 1 %.

Pour l'hydrolyse, les proportions dans le tube sont de 1 mL de maxilase pour 10 mL d'empois.

La disparition complète de l'amidon est obtenue en 25 à 30 mn au bain-marie à 37 °C. Même suivi sur plaque mais on peut le faire directement sur la paillasse !

Juste un "truc" : l'empois se conserve quelques heures au réfrigérateur mais la solution colloïdale à tendance à se déposer. A agiter avant d'utiliser pour que la durée de la manip soit la même pour les différents groupes d'élèves.