

## TP n° 02

### Etude d'une hydrolase : Amylase

**Extrait enzymatique** : (grains d'orge)

Les plantules âgées de 4 à 5 jours sont utilisées pour l'extraction de l'amylase.

5 g de plantule sont broyés en présence de 1g de sable dans 25 ml d'eau distillée.

Le broya est ensuite centrifugé et filtré.

**Substrat** :

1g d'empois d'amidon est solubilisé dans 100 ml d'eau distillée et gardé à 4°C.

**Solution** :

1/ Solution Tampon d'un pH de 4 à 9,5.

2/ Solution Tampon « T ».

3/ Solution de Lugol.

4/ Solution stop « S »

1/ **Teste de l'activité enzymatique de l'amylase** :

Dans chaque tube à essai, réaliser le mélange suivant :

Tube n°	1	2	3	4	5
Extrait enzymatique (ml)	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
Eau distillée (ml)	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
Substrat (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution Tampon (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

- 1- Incuber au bain-marie à 37°C.
- 2- Préparer la plaque à lugol (chaque puits contient 100µl de lugol).
- 3- Prélever à chaque (1) minute 20 µl du milieu réactionnel et les rajouter aux 100µl de lugol de la plaque ( le temps 0 correspond au temps avant- incubation à 37° C).
- 4- Répéter cette opération jusqu'à disparition totale de l'amidon (coloration jaunatre du lugol).
- 5- Amidon → Amylopectine → Hydrodextrine → **Achrodextrine** → Maltose

➤ Déterminer le temps maximal de la catalyse

## **2/ Influence du pH du milieu sur l'activité de l'amylase :**

Dans chaque tube à essai, réaliser le mélange suivant :

Tube n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Solution Tampon (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Substrat (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Mettre ce mélange au bain- marie à 37°C pendant 2 minutes												
Extrait enzymatique (ml)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Eau distillée (ml)	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y	y

X et y à déterminer de 1

1/- Incuber au bain-marie pendant 3 minutes à 37°C.

2/- Stopper la réaction avec 3 ml de la solution « S ».

3/- A 300 µl du mélange, ajouter 3ml de la solution de lugol.

4/- Lire l'Absorbance à 660 nm / 500 nm.

- Sur un graphe représenter  $A_{660} = f(\text{pH})$ .
- Déterminer graphiquement l'activité enzymatique optimal en fonction du pH.

## **3/ Influence de la température sur l'activité de l'amylase :**

Dans chaque tube à essai, réaliser le mélange suivant :

Tube n°	1	2	3	4	5	6
Substrat (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution Tampon (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Température	25	30	35	40	45	50
Extrait enzymatique (ml)	x	x	x	x	x	x
Eau distillée (ml)	y	y	y	y	y	y

X et y à déterminer de 1

1/- Incuber au bain-marie pendant 3 minutes aux température indiquées au tableau.

2/- Stopper la réaction avec 3 ml de la solution « S ».

3/- A 300 µl du mélange, ajouter 3ml de la solution de lugol.

4/- Lire l'Absorbance à 660 nm / 500 nm.

- Sur un graphe représenter  $A_{660} = f(T)$ .
- Déterminer graphiquement l'activité enzymatique optimal en fonction de la température.

#### **4/- Détermination des paramètres cinétiques ( Vm, Km ) :**

Préparer les dilutions du substrat à partir de la solution mère

Tube n°	1	2	3	4	5	6
Substrat (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Eau distillée (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0
Concentration ( mg/ml)	?	?	?	?	?	?

- Compléter le tableau de dilution.

Dans chaque tube à essai, réaliser le mélange suivant :

Tube n°	1	2	3	4	5	6
Substrat (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Solution Tampon (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Extrait enzymatique (ml)	x	x	x	x	x	x
Eau distillée (ml)	y	y	y	y	y	y

( ) à déterminer de « 2 »

X et y à déduire de « 1 »

T° à déduire de « 3 »

1/- Incuber au bain-marie pendant 3 minutes a la température « T° » à déduire de « 3 ».

2/- Stopper la réaction avec 3 ml de la solution « S ».

3/- A 300 µl du mélange, ajouter 3ml de la solution de lugol.

4/- Lire l'Absorbance à 660 nm / 500 nm.

- Tracer la courbe  $1/V_0 = f(1/[S])$ .
- Calculer Km et Vm pour l'amylose à la concentration utilisée.

