

Module : Enzymologie Appliquée et Génie Enzymatique
 2^{ème} Master BFA et MFA

TP4: Activité de la catalase de source végétale: Effet des concentrations en enzyme et en substrat

La CAT se trouve principalement dans les peroxyosomes, et sa fonction principale est d'éliminer le H₂O₂ généré lors de l'oxydation des acides gras. La présence de NADPH lié à chaque sous-unité peut aider à protéger l'enzyme contre l'inactivation par H₂O₂. L'activité la plus élevée de cette enzyme semble se situer dans le foie et les érythrocytes. La catalase utilise du fer ou du manganèse comme cofacteur et catalyse la dégradation ou la réduction du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) pour produire de l'eau et de l'oxygène moléculaire. La catalase est très efficace pour décomposer des millions de molécules de H₂O₂ en une seconde. La conversion de H₂O₂ en eau et en oxygène moléculaire a lieu en deux étapes :

- Catalase-Fe (III) + H₂O₂ → composé I
- Composé I + H₂O₂ → Catalase - Fe (III) + 2 H₂O + O₂
- *Composé I = Fer complexé avec un atome d'oxygène (radical centré oxyferryl porphyrine).

Mode opératoire

Préparation de l'extrait enzymatique

- Mixer ou râper 100 g de pomme de terre/Navet /carotte/ Aneth et l'ail épluchée.
- Broyer dans 60 mL d'eau distillée à 4°C avec pilon et mortier froids (stockés au congélateur).
- Filtrer sur gaze de coton tissé (ou centrifuge a 2000 rpm/min).
- Tester une goutte du filtrat à l'eau iodée. S'il reste de l'amidon, réaliser une seconde filtration.
- Tester l'extrait le plus riche en catalase dans un tube contenant 20 ml de solution à 3% de catalase.
- Conserver le broyat filtré sur la glace.
- Préparer une gamme des différentes concentrations de broyat filtré (le plus riche en catalase).

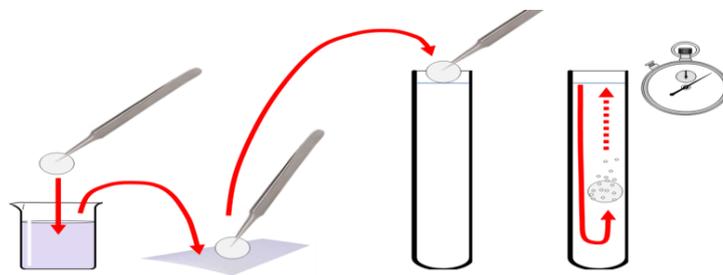
Solution / tube		A	B	C	D	E	F
Dilution du broyat filtré		0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Quantités pour 10 mL	Broyat filtré	1	2	4	6	8	10
	Eau distillée	9	8	6	4	2	0

1- Test de l'influence de la concentration en substrat

- Annoter 6 tubes à essai, de 1 à 6
- Remplir les tubes avec 20 mL de la dilution correspondante du substrat (Déjà préparé)

Solution / tube	1	2	3	4	5	6
H ₂ O ₂	0,2 %	0,5 %	0,75 %	1 %	2 %	3 %

- Avec une pince fine, tremper un disque de papier filtre dans le broyat de Extrait sélectionné
- Égoutter brièvement l'excédent sur un papier absorbant
- Déposer le disque verticalement dans le liquide en haut du tube à essai. Immédiatement déclencher le chronomètre
- Mesurer le temps que met le disque pour revenir en surface après avoir coulé.
- Consigner la valeur dans le tableau de recueil des mesures
- Recommencer à l'étape 3 pour tester chaque tube.



2- Test de l'influence de la concentration en enzyme

- Annoter 6 tubes à essai, de A à F
- Remplir les tubes avec 20 mL de H₂O₂ 3%
- Avec une pince fine, tremper un disque de papier filtre dans le broyat de pomme de terre /navet ou carotte.

Solution / tube	A	B	C	D	E	F
Dilution du broyat filtré	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1

- Égoutter brièvement l'excédent sur un papier absorbant
- Déposer le disque verticalement dans le liquide en haut du tube à essai. Immédiatement déclencher le chronomètre
- Mesurer le temps que met le disque pour revenir en surface après avoir coulé.
- Consigner la valeur dans le tableau de recueil des mesures (format HH:MM:SS)
- Recommencer à l'étape 3 pour tester chaque tube.