AT Extraction de la peroxydase de légumes de la famille des *Brassicaceae*

**Contexte de la situation et activités à réaliser**

L’objectif de cette activité technologique est de découvrir les procédés d’extraction et de purification des enzymes ainsi que la méthodologie de suivi de l’enzyme d’intérêt lors des différentes étapes.

Nous allons extraire la peroxydase de certains légumes : le navet, le radis noir et le radis rose puis envisager des étapes de purification de l’extrait à l’aide d’une étude documentaire.

Des étapes de purification de la peroxydase à partir d’extraits bruts des mêmes légumes racines ont été réalisées.

Vous devez contrôler l’efficacité de cette purification. Pour cela vous aurez :

* à déterminer l’activité enzymatique peroxydase de chaque fraction (extrait brut et extrait purifié)
* à déterminer la concentration en protéines de chaque fraction par spectrophotométrie dans l’UV;
* à calculer les activités enzymatiques peroxydase totale et spécifique de chaque fraction ;
* à calculer le rendement et l’enrichissement des étapes de purification.

Vous pourrez en conclusion de l’étude comparer les résultats obtenus pour les 3 légumes racines étudiés.

Parallèlement nous étudierons la protéine à l’aide d’outils informatiques ainsi que les séquences d’ADN codant la peroxydase présente chez les 3 espèces de *Brassicaceae*.

**Accessibilité des ressources scientifiques et techniques**

**Documents mis à disposition pour cette séance :**

*Protocole d’extraction*

*Protocole de mesure de l’activité enzymatique*

*Protocole de dosage des protéines par spectrophotométrie UV*

*Fiche théorie “Activité catalytique enzymatique”*

# Travail préparatoire et d’exploitation

Protocole 1: Extraction de la peroxydase de légumes.

Q1. Réaliser un organigramme du protocole 1. Préciser le nom du végétal que vous utiliserez pour l’extraction.

Protocole 2: détermination de l’activité peroxydase de l’extrait brut obtenu

Q2. Après lecture du protocole 2, préciser la méthode utilisée pour suivre la réaction catalysée par la peroxydase et permettre la détermination de l’activité enzymatique.

Q3. Préparer un tableau de manipulation pour le protocole 2.

Q4. Préparer un tableau permettant de noter les indications lues au spectrophotomètre.

Protocole 3 : Dosage des protéines par spectrophotométrie UV

Q5. Préparer un tableau permettant de noter les indications obtenues.

Q6. Le TD bio-informatique n°1 donne des informations quant aux propriétés de la protéine. Grâce à ces informations, à vos connaissances sur les propriétés générales des protéines et les techniques de séparation étudiées en biotechnologies, proposer une ou plusieurs techniques qui permettraient de purifier la peroxydase contenue dans l’extrait brut.

# Réalisation pratique

T1. Extraire la peroxydase du légume choisi à l’aide du protocole 1

T2. Réaliser la détermination de l’activité péroxydase de l’extrait brut et de l’extrait purifié à l’aide du protocole 2

T3. Réaliser le dosage des protéines par spectrophotométrie UV à l’aide du protocole 3.

# Résultats et compte rendu

Q7. Compléter le tableau placé en annexe en réalisant les calculs pour le légume racine que vous avez étudié. Renseigner la feuille de calcul rassemblant les résultats du groupe.

Q8. Calculer le rendement du protocole de purification choisi.

$R=\frac{z\_{ étape n}}{z\_{ étape n-1}} ×100 $avec *z* activité catalytique **totale** de l’extrait.

Q9. Calculer l’enrichissement obtenu par l’étape de purification de l’extrait brut.

$$E=\frac{z\_{sp étape n}}{z\_{sp étape n-1}}$$

Q10. Présenter sous la forme la plus appropriée, les informations obtenues par le groupe classe pour les 2 autres légumes racines (activité totale, enrichissement, rendement) ainsi que vos résultats. Conclure.

**Protocole 1 Extraction de la peroxydase de la racine pivotante (navet ou radis).**

Echantillon

* racine pivotante : radis noir, blanc ou rouge, navet

Matériel et réactifs

* tampon phosphate à 50 mmol.L-1
* balance à 0,01 g
* mortier et pilon
* porte-filtre, entonnoir et gaze
* tube à centrifuger
* centrifugeuse
* éprouvettes de 25 mL

Mode opératoire

* Eplucher la racine.
* Peser 25 g de racine. Noter la masse pesée à 0,01 g près.
* Emincer la racine dans un mortier à l’aide d’un couteau.
* Préparer 25 mL de tampon phosphate dans une éprouvette de 25 mL.
* Placer le mortier dans la bassine de glace. Ajouter 10 à 15 mL de tampon dans le mortier et broyer à l’aide du pilon jusqu’à obtenir une suspension homogène sans morceaux (10 à 20 minutes). Ajouter progressivement le reste du tampon.
* Filtrer le contenu du mortier sur gaze.
* Récupérer le filtrat dans un tube à centrifuger de 50 mL, le conserver dans la glace.
* Centrifuger 10 min à 4000 tr/min.
* Mesurer le volume d’extrait brut obtenu à l’aide d’une éprouvette graduée et noter ce volume. Conserver l’extrait dans la glace.

**Protocole 2 Détermination de l’activité catalytique de la peroxydase dans l’extrait**

Echantillon

* Extrait enzymatique

Matériel et réactifs

* tampon phosphate à 50 mmol.L-1
* solution de gaïacol en eau distillée à 1g.L-1
* peroxyde d’hydrogène concentré à diluer aux 1/100 extemporanément.

Mode opératoire

* Préparer le spectrophotomètre pour réaliser une cinétique de la réaction catalysée par la peroxydase sur 3 minutes à 470 nm.
* Préparer une dilution de l’extrait enzymatique brut au 1/20 en tampon phosphate
* Introduire dans une cuve témoin
	+ 0,5 mL de solution de gaïacol à 1 g.L-1
	+ 0,5 mL de tampon
	+ 25 µL d’extrait
* Réaliser la référence au spectrophotomètre.
* Introduire dans une cuve essai
	+ 0,5 mL de tampon phosphate pH 7 à 50 mmol.L-1
	+ 0,5 mL de solution de gaïacol à 1 g.L-1
	+ 50 µL de peroxyde d’hydrogène 1V
	+ 25 µL d’extrait (ajouté juste avant la lecture au spectrophotomètre)
* Poser un parafilm sur la cuve et homogénéiser.
* Introduire aussitôt dans le spectrophotomètre et lancer l’acquisition.
* Noter les absorbances toutes les 15 secondes sur 3 minutes.

Donnée : εmolécule colorée à 470 nm = 2480 L.mol-1.cm-1

**Protocole 3 Dosage des protéines par spectrophotométrie UV**

Echantillon

* Extrait enzymatique

Matériel et réactifs

* tampon phosphate à 50 mmol.L-1
* cuve spéciale UV

Mode opératoire

* Réaliser une cuve témoin avec le tampon phosphate pour la référence.
* Réaliser une cuve essai avec l’extrait dilué au 1/20.
* Lire les absorbances à 280 nm.

On peut interpréter les absorbances mesurées jusqu’à A280<0,600 (limite de linéarité). Une gamme d’étalonnage avec une solution de protéines de concentration connue a permis d’établir la relation suivante : A280 = 1 correspond à 1,83 mg/mL.

ANNEXE : Exploitation des résultats Noms élèves :

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| LégumeRacine : | $$m\_{légume} =$$ | **Protéines**(Dosage U.V.) | **Activité de la peroxydase**(méthode cinétique en continu) | **Activité spécifique de la fraction étudiée** |
| Fraction | $$Vextrait total$$(L) | $$ρ\_{(protéine ; extrait)}= A\_{extraitdilué}^{280 nm}×1,83×Fd (g.L^{-1})$$ | $∆A/∆t$ (min-1) :Coefficient directeur de la période initiale (courbe A en fonction du temps en minutes) | Concentration d’activité catalytique$$b\_{(peroxydase ;extrait)}=\frac{∆A}{∆t}×\frac{1}{ε\_{complexe orangé}^{470 nm}×l}×\frac{V\_{cuve}}{V\_{extrait cuve}}(U.L^{-1})$$*Attention il faut des µmol* | Activitécatalytique totale de la fraction$$z\_{peroxydase dans extrait total}=b\_{(peroxydase ; extrait)}×V\_{extrait total} (U)$$ | Activité catalytique spécifique de la fraction$$z\_{sp}\_{peroxydase dans extrait total}=\frac{b\_{(peroxydase ; extrait)}}{ρ\_{(protéine ; extrait)}} (U.g^{-1})$$ |
| Extrait brut |  |  |  |  |  |  |
| Extraitpurifié |  |  |  |  |  |  |