



Comment prévenir le brunissement des pommes ?

- Etude de l'oxydation du pyrocatechol et recherche d'inhibiteurs -

Santé et prévention

n° 27258

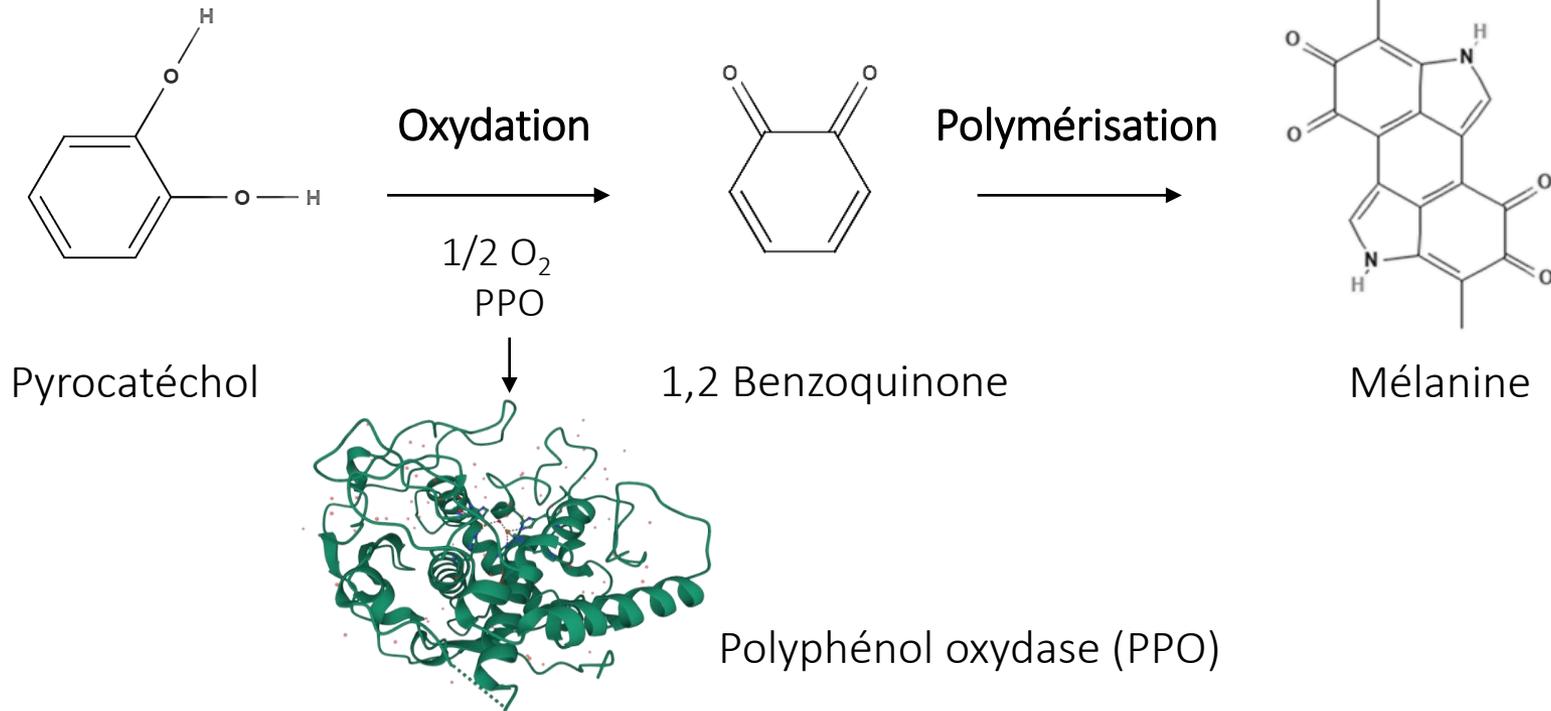
Observations

→ Brunissement de la Pink Lady après 20 minutes

Comment prévenir le brunissement des pommes ?



La réaction

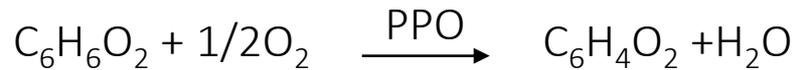


Bilan de la catalyse enzymatique



Tracé des molécules à l'aide de Molview.org et enzyme issue de <https://www.rcsb.org/3d-view/1BT1/1>

Les solutions



Problématique : Comment ralentir le brunissement de la pomme de manière simple et non nocive ?

Objectif : suivre l'oxydation du pyrocatechol cinétiquement pour tester des inhibiteurs

“How should apples be prepared for a fruit salad?”, JCE, 2020, 97, 4475–4481

Sommaire

I Le modèle de Michaelis Menten

- a. Modèle et suivi cinétique
- b. Linéarisation Lineweaver-Burk

II Mise en place du protocole général et observation du phénomène

- a. Conditions opératoires
- b. Le modèle Michaelien est-il applicable à la pomme ?

III

Etude du mécanisme d'inhibition par l'acide citrique

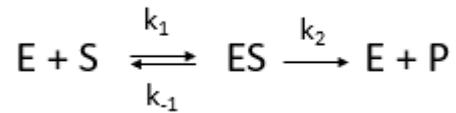


- a. L'acide citrique, un inhibiteur ?
- b. Comment le modèle de Michaelis Menten nous renseigne-t-il sur l'inhibition par l'acide citrique ?

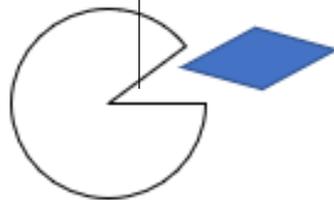
I. Le modèle de Michaelis Menten

I. Le modèle de Michaelis Menten

a. Modèle et suivi cinétique



Site actif



E + S



ES



E+P

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{v_{\max}}$$

$$v_{\max} = k_2[E]_0 \quad K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

I. Le modèle de Michaelis Menten

b. Linéarisation Lineweaver-Burk

→ Suivi spectrophotométrique

Loi de Beer-Lambert

$$\left. \frac{dA}{dt} \right|_0 = l\varepsilon \left. \frac{d[P]}{dt} \right|_0 = l\varepsilon v_0$$



$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{v_{\max}}$$



Cuves de différentes concentrations en substrat (pyrocatechol) après catalyse enzymatique au contact de l'air

→ Réactif incolore et produit coloré : on peut déterminer K_m et v_{\max} par suivi cinétique de l'absorbance

II. Mise en place du protocole général et observation du phénomène

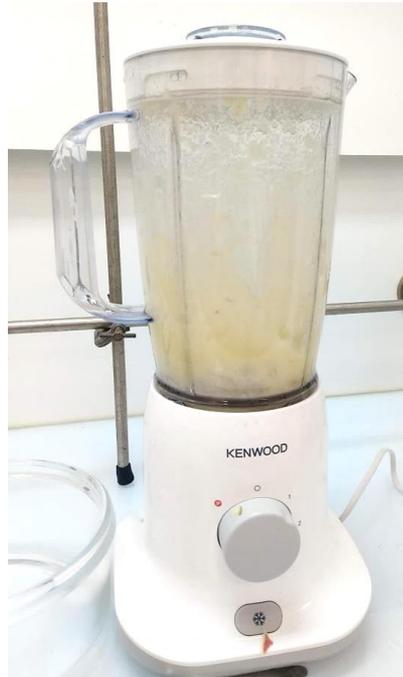
II. Mise en place du protocole général et observation du phénomène

a. Conditions opératoires

→ Extraction de l'enzyme



Découpe



Extraction



Filtration

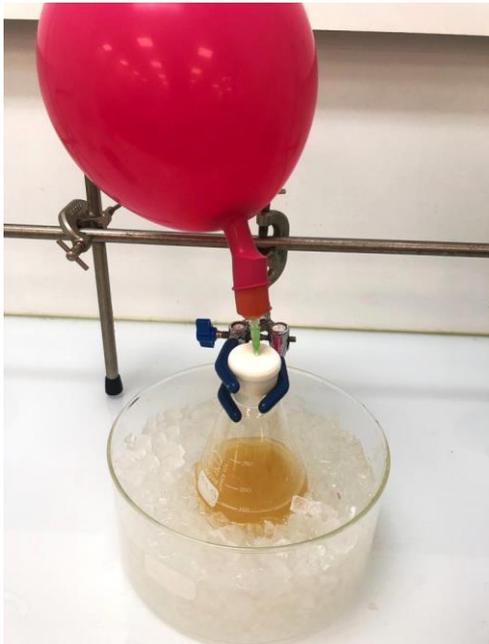


Centrifugeuse

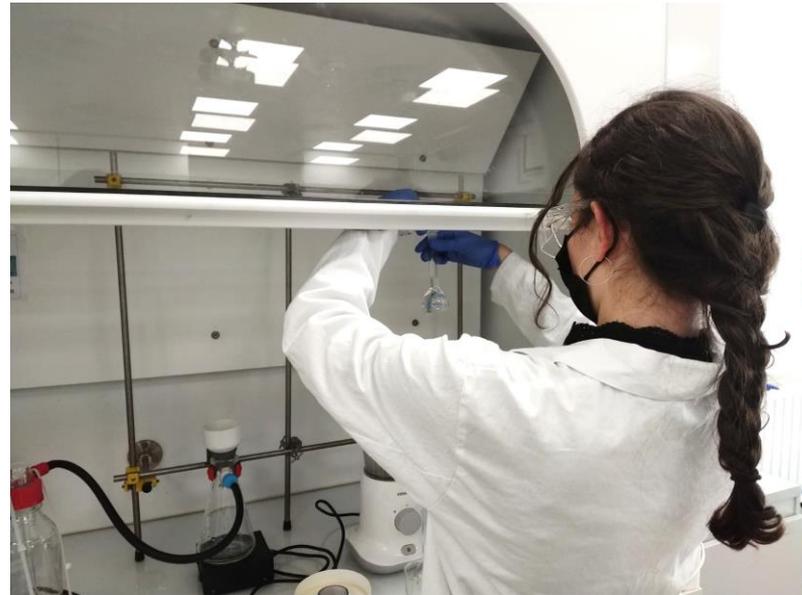
II. Mise en place du protocole général et observation du phénomène

a. Conditions opératoires

→ Préparation du pyrocatechol



Conservation du jus
(enzyme) sous argon

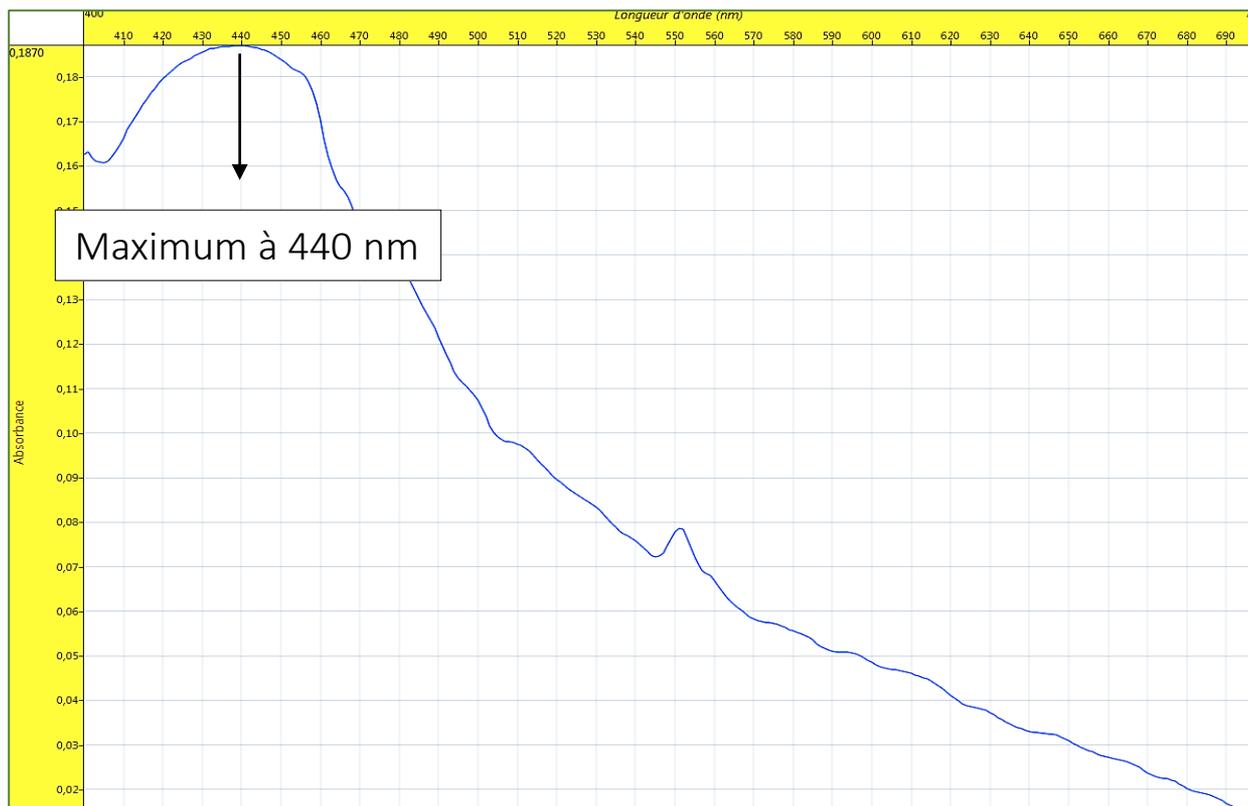


Préparation du pyrocatechol à 0,5 g/L :
25 mg dans 50 mL de tampon ou eau

II. Mise en place du protocole général et observation du phénomène

a. Conditions opératoires

→ Choix de la longueur d'onde d'étude



Spectre d'absorption de la mélanine (réalisé avec une cuve après oxydation)

II. Mise en place du protocole général et observation du phénomène

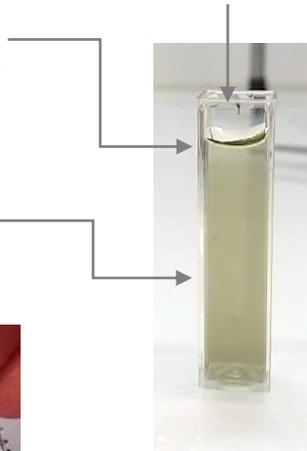
a. Conditions opératoires

→ Choix du milieu (avec ou sans tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH = 6,5))

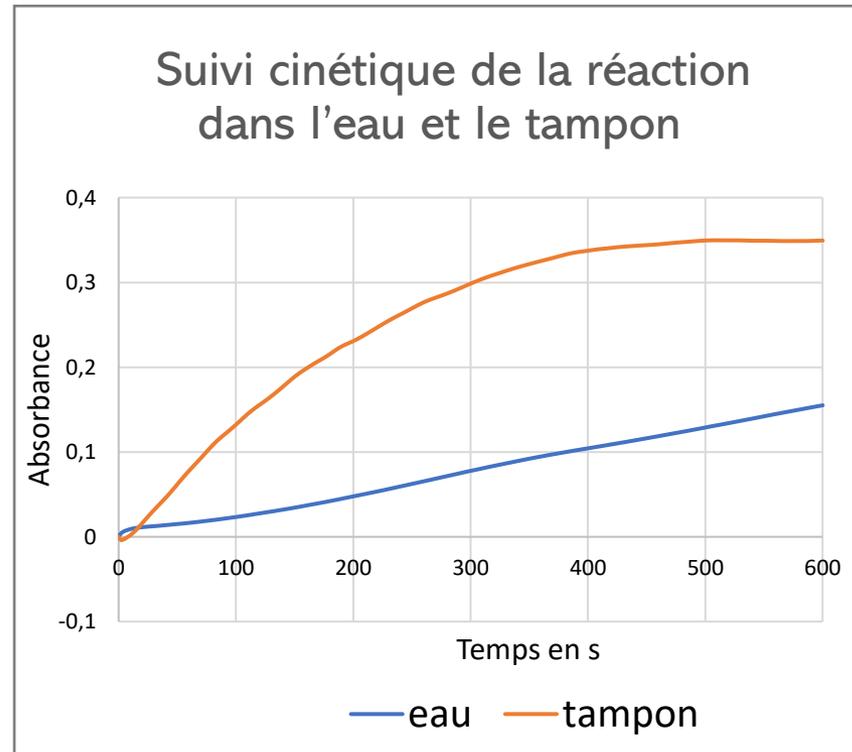
0,5 mL de **pyrocatechol** à 0,5 g/L (dilué dans du tampon ou de l'eau)

1 mL de jus de pomme (**enzyme**)

1 mL de **solvant** (tampon ou eau)



pH de l'eau : 5



→ Tampon

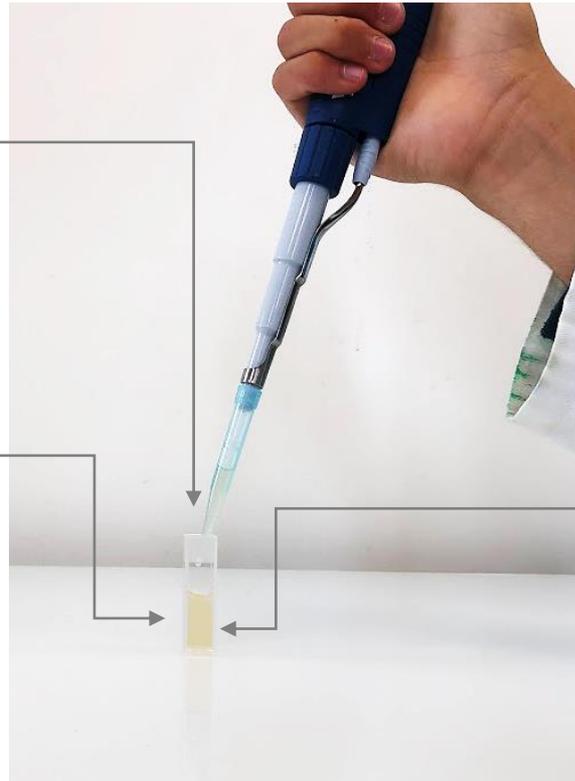
II. Mise en place du protocole général et observation du phénomène

a. Conditions opératoires

→ Préparation des cuves de concentrations différentes en $[S]_0$

$[S]_0$: x mL de
pyrocatechol à 0,5 g/L
(dilué dans le tampon)

2-x mL de **tampon**

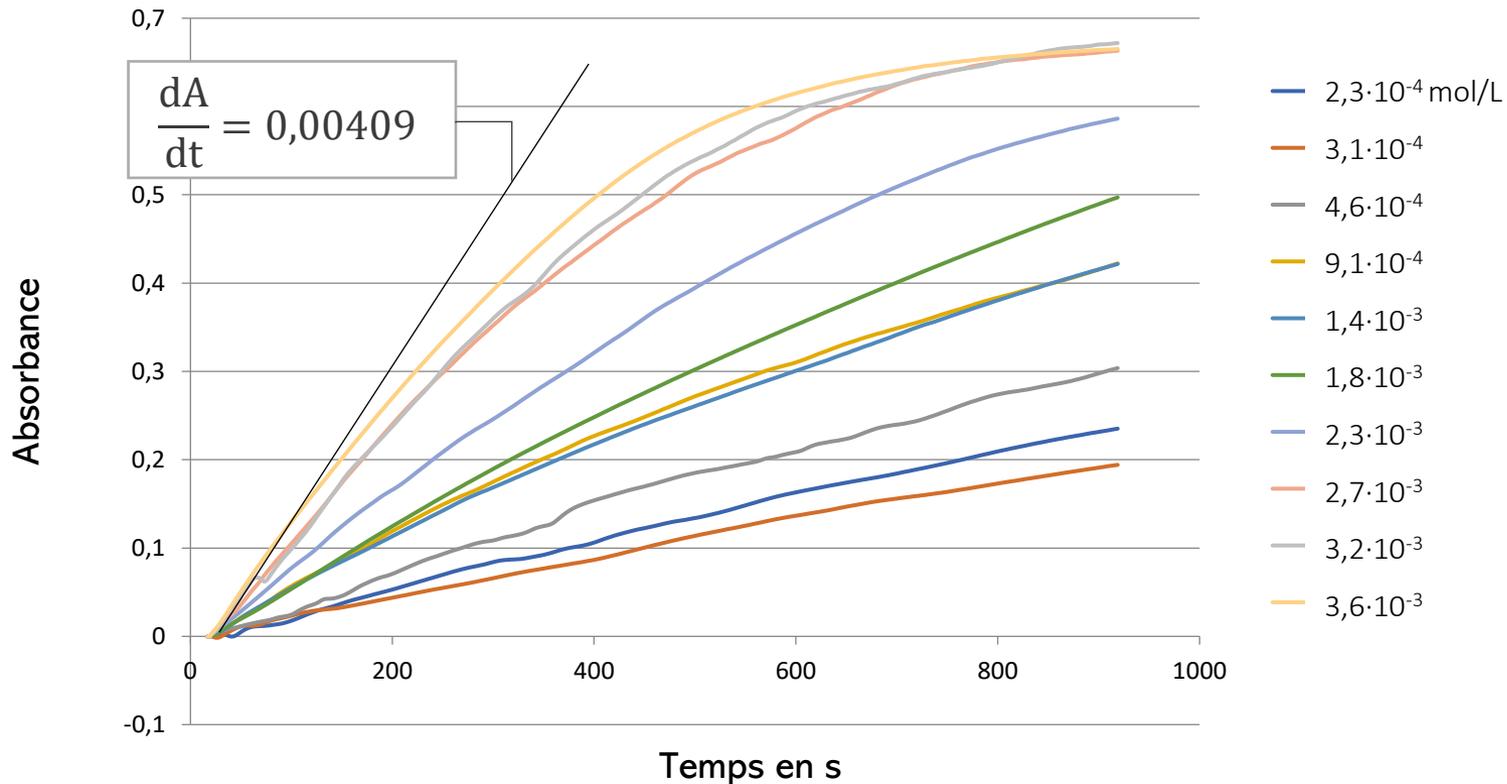


0,5 mL de jus de
pomme (**enzyme**)

II. Mise en place du protocole général et observation du phénomène

b. Le modèle est-il valide ?

Absorbance en fonction du temps pour des cuves de concentrations en substrat $[S]_0$ différentes

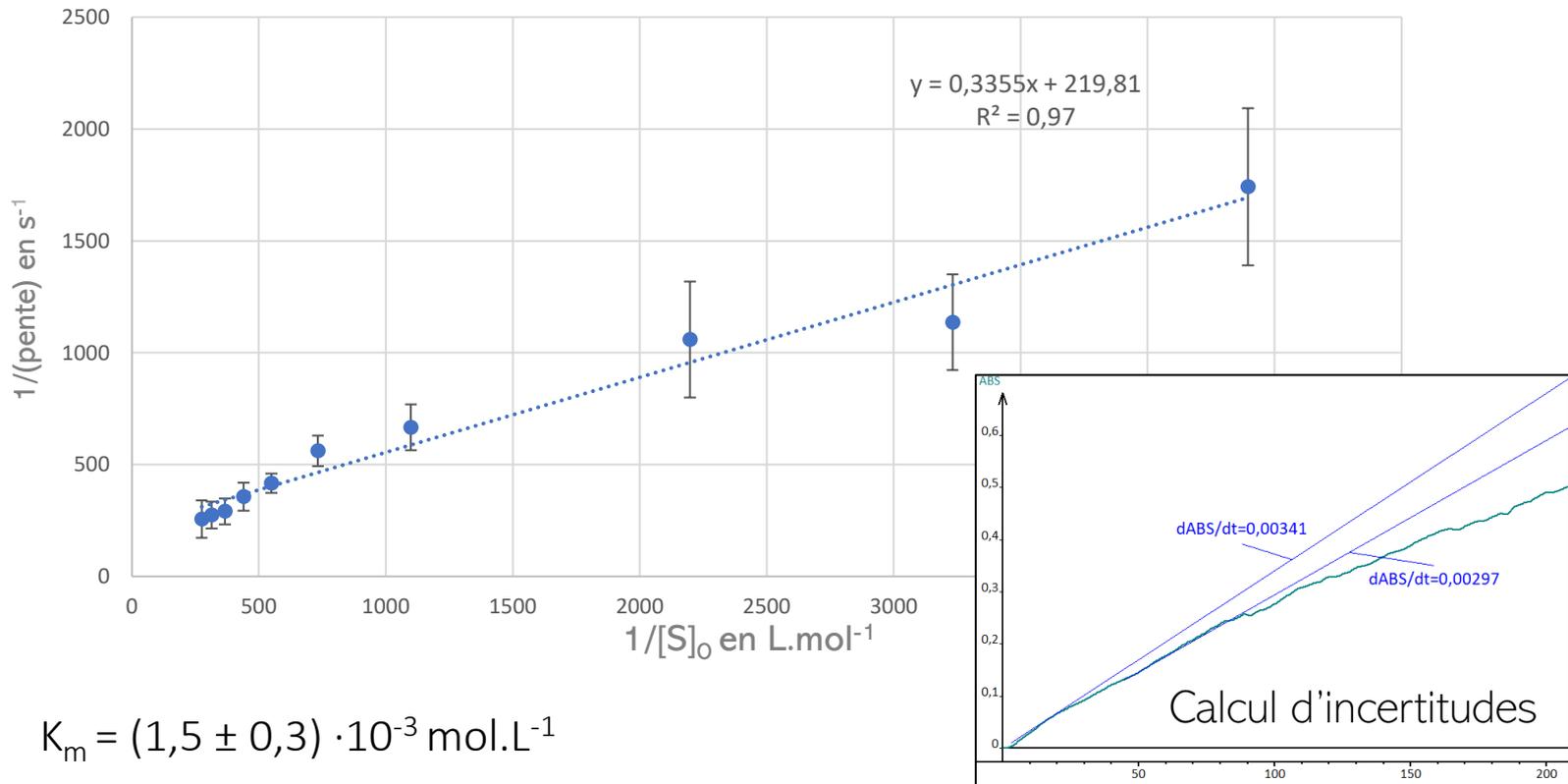


II. Mise en place du protocole général et observation du phénomène

b. Le modèle est-il valide ?

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Linéarisation Lineweaver-Burk



II. Mise en place du protocole général et observation du phénomène

- Le **modèle** peut être **appliqué** à la pomme
- On peut trouver une valeur de K_m
- Cette valeur de K_m va nous permettre de tester un **inhibiteur** : l'acide citrique

III. Etude du mécanisme ← d'inhibition par l'acide citrique

III. Etude du mécanisme d'inhibition par l'acide citrique

a. L'acide citrique, un inhibiteur ?

→ 1^{ère} action : diminution du pH



Sally S Hunnicutt <sshunnic@vcu.edu>

À moi ▾

mer. 15 sept. 2021 17:50



🇺🇸 anglais ▾ > français ▾ Traduire le message

Désactiver pour : anglais ✕

The benzoquinone - the product of the oxidation of catechol - absorbs light at 540 nm. The benzoquinone makes the fruit (apple juice mixture) turn brown. If the enzyme works, the catechol is converted to quinone and the solution turns brown. This happens if the pH is correct. If the solution pH is too acidic, the enzyme is inhibited and the solution does not brown. Some apples are naturally acidic and won't brown unless the apple juice extract is made in a buffer.

I hope this helps.

Yours, distantly,
Sally Hunnicutt

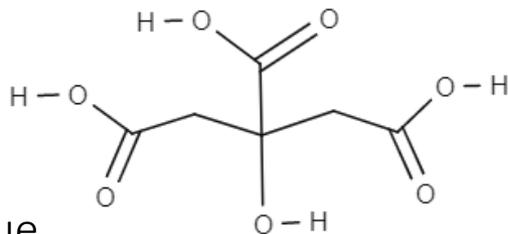
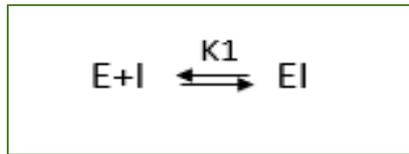
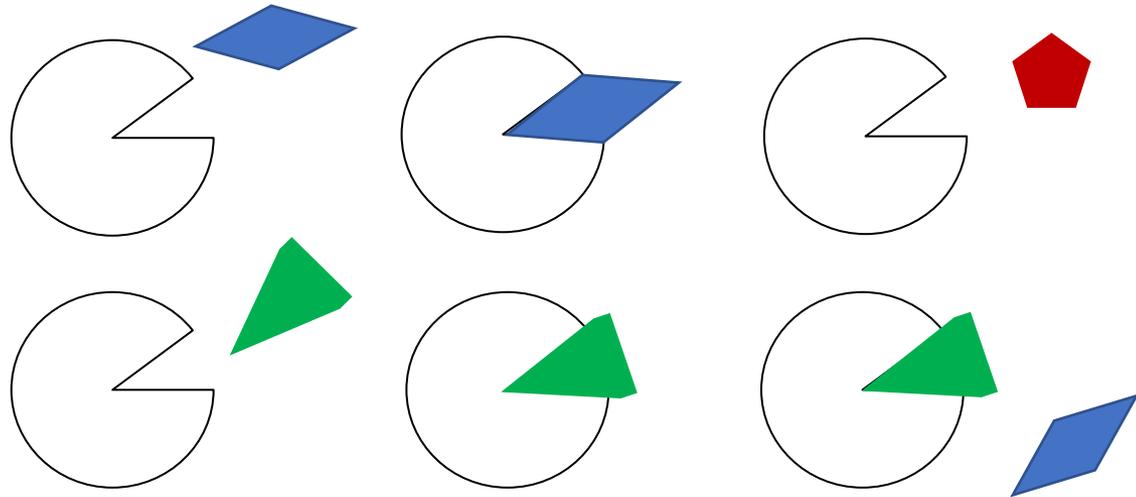
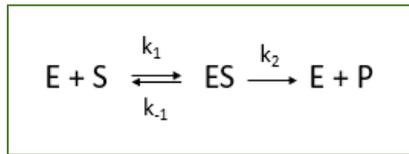


Influence du pH sur le brunissement

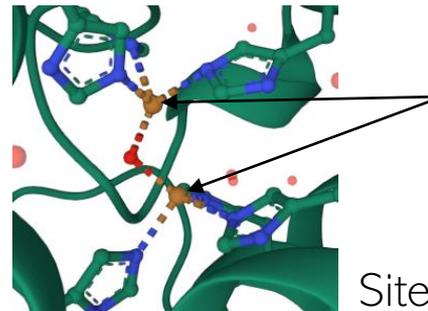
III. Etude du mécanisme d'inhibition par l'acide citrique

a. L'acide citrique, un inhibiteur ?

→ 2^{ème} action : inhibition compétitive, formation d'un complexe par chélation



L'acide citrique



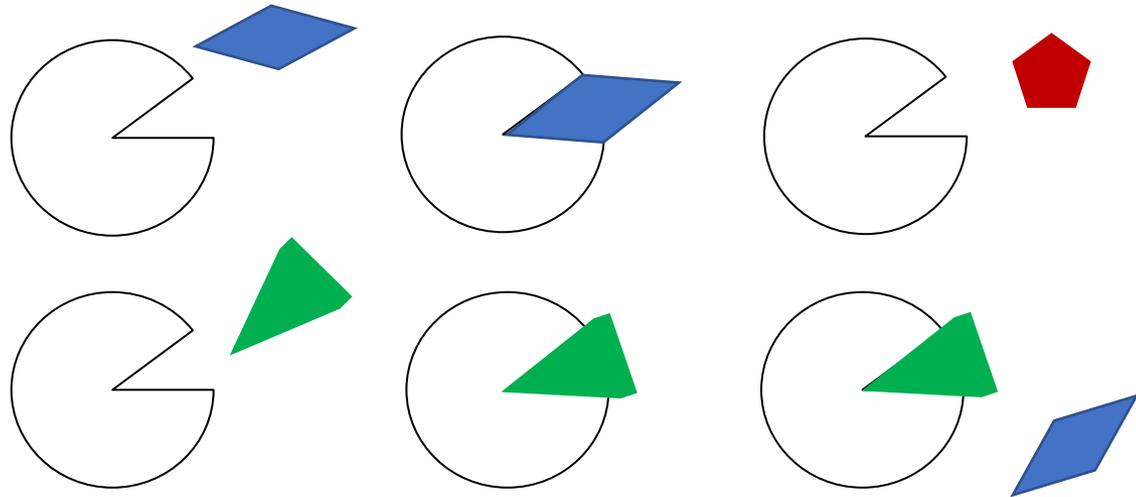
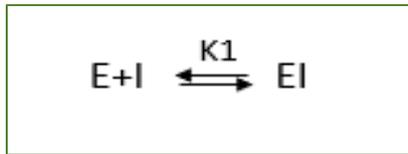
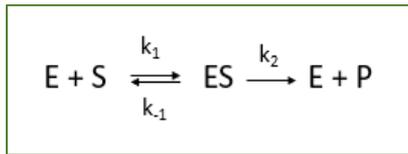
Cuivre

Site actif de l'enzyme

III. Etude du mécanisme d'inhibition par l'acide citrique

a. L'acide citrique, un inhibiteur ?

→ Inhibition compétitive : loi de vitesse



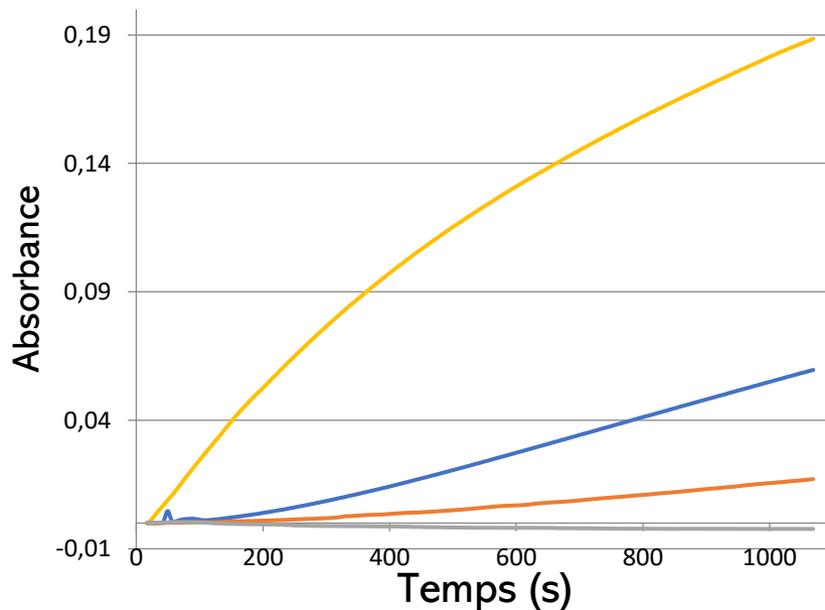
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{[S]_0 v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_1} \right) + \frac{1}{v_{\max}}$$
$$K_1 = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

III. Etude du mécanisme d'inhibition par l'acide citrique

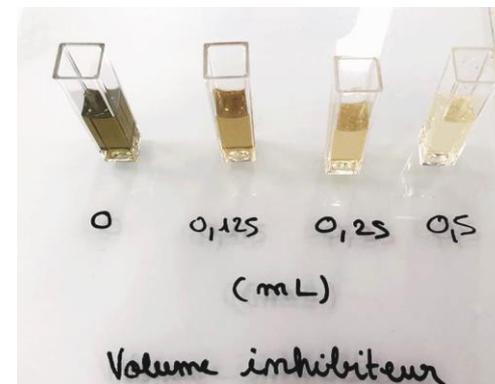
b. Comment le modèle de Michaelis Menten nous renseigne-t-il sur l'inhibition par l'acide citrique ?

→ Recherche du volume d'inhibiteur à introduire dans les cuves pour $[I] = 5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol/L}$

Suivi cinétique de l'absorbance pour les différents volumes d'inhibiteur introduits



— V inhibiteur = 0 mL
— V inhibiteur = 0,125 mL
— V inhibiteur = 0,25 mL
— V inhibiteur = 0,50 mL



III. Etude du mécanisme d'inhibition par l'acide citrique

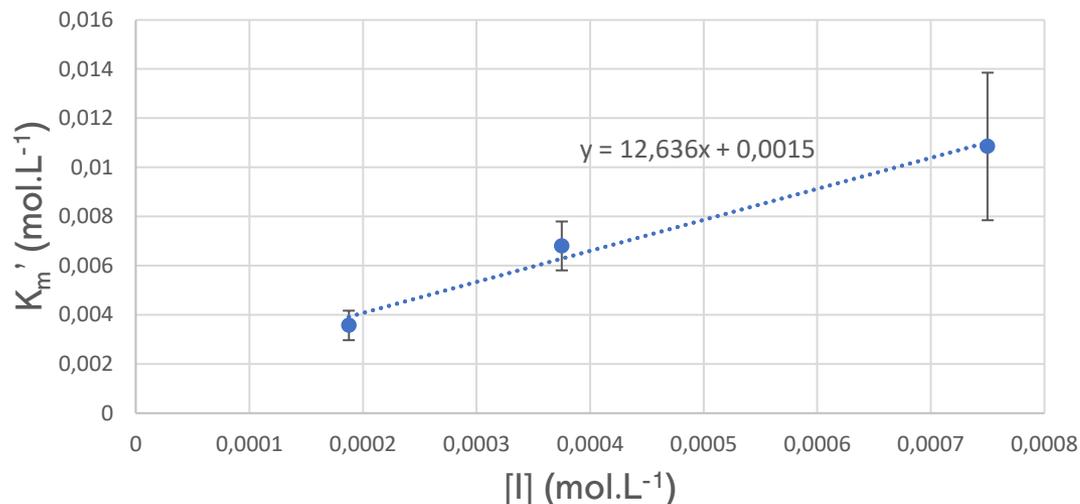
b. Comment le modèle de Michaelis Menten nous renseigne-t-il sur l'inhibition par l'acide citrique ?

→ Même protocole pour déterminer K_m'

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m'}{[S]_0 v_{\max}} + \frac{1}{v_{\max}}$$

Volume inhibiteur	0,125 mL	0,25 mL	0,5 mL
$K_m' = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \cdot K_m$	$(3,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$	$(7 \pm 1) \cdot 10^{-3}$	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$

K_m' en fonction de la concentration en inhibiteur



$$K_m' = 12,636 \cdot [I] + 0,0015$$

$$K_i = (1,2 \pm 0,6) \cdot 10^{-4} \text{ mol/L}$$

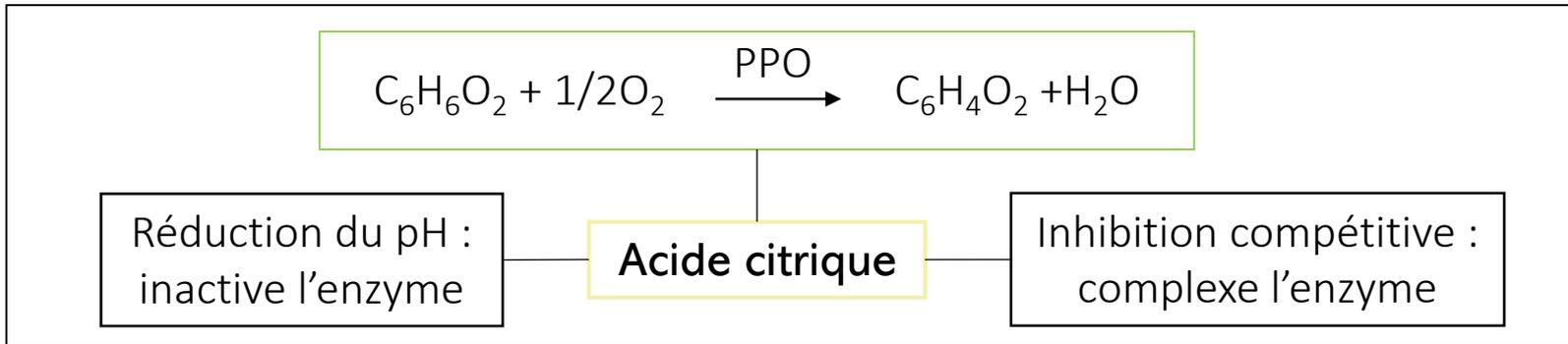
III. Etude du mécanisme d'inhibition par l'acide citrique

Etude de l'acide citrique :

- $K_1 = 1,2 \cdot 10^{-4} \ll 1$: **complexe** enzyme/inhibiteur favorisé
- $K_m' > K_m$: Inhibition compétitive
- Diminution du pH

Conclusion

Problématique : Comment ralentir le brunissement de la pomme de manière simple et non nocive ?

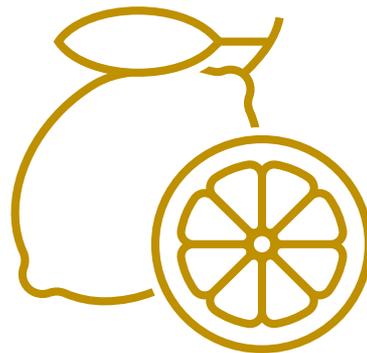


Inhibition

Acide citrique

Acide ascorbique

pH faible



→ Spray

Consommateur et environnement

Non nocif

Non visible

Accessible

Merci de votre attention

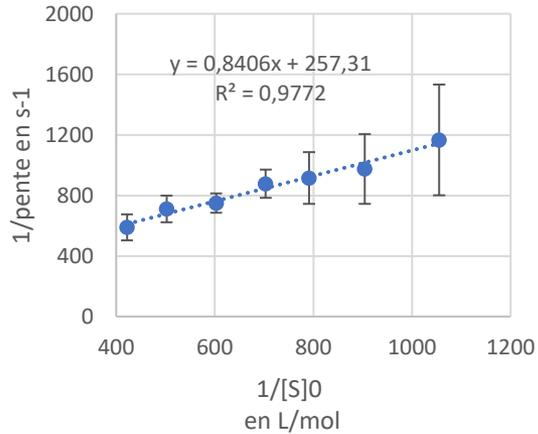


Paul Cézanne, Nature morte aux pommes

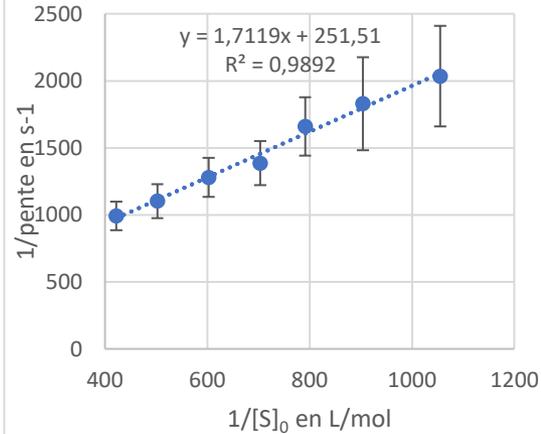
Annexes

Linéarisation Lineweaver-Burk avec 3 volumes d'acide citrique

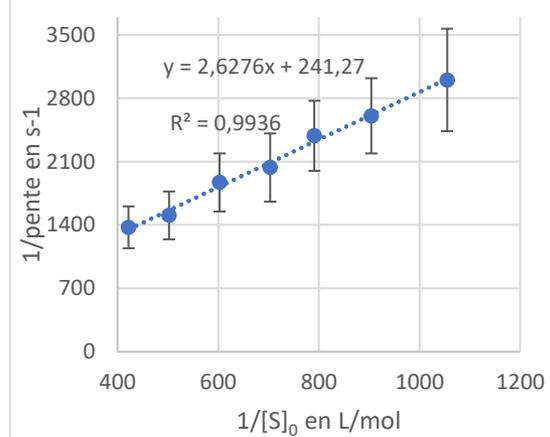
1/pente en fonction de $1/[S]_0$
Vinhibiteur = 0,125 mL



1/pente en fonction de $1/[S]_0$
Vinhibiteur = 0,25 mL

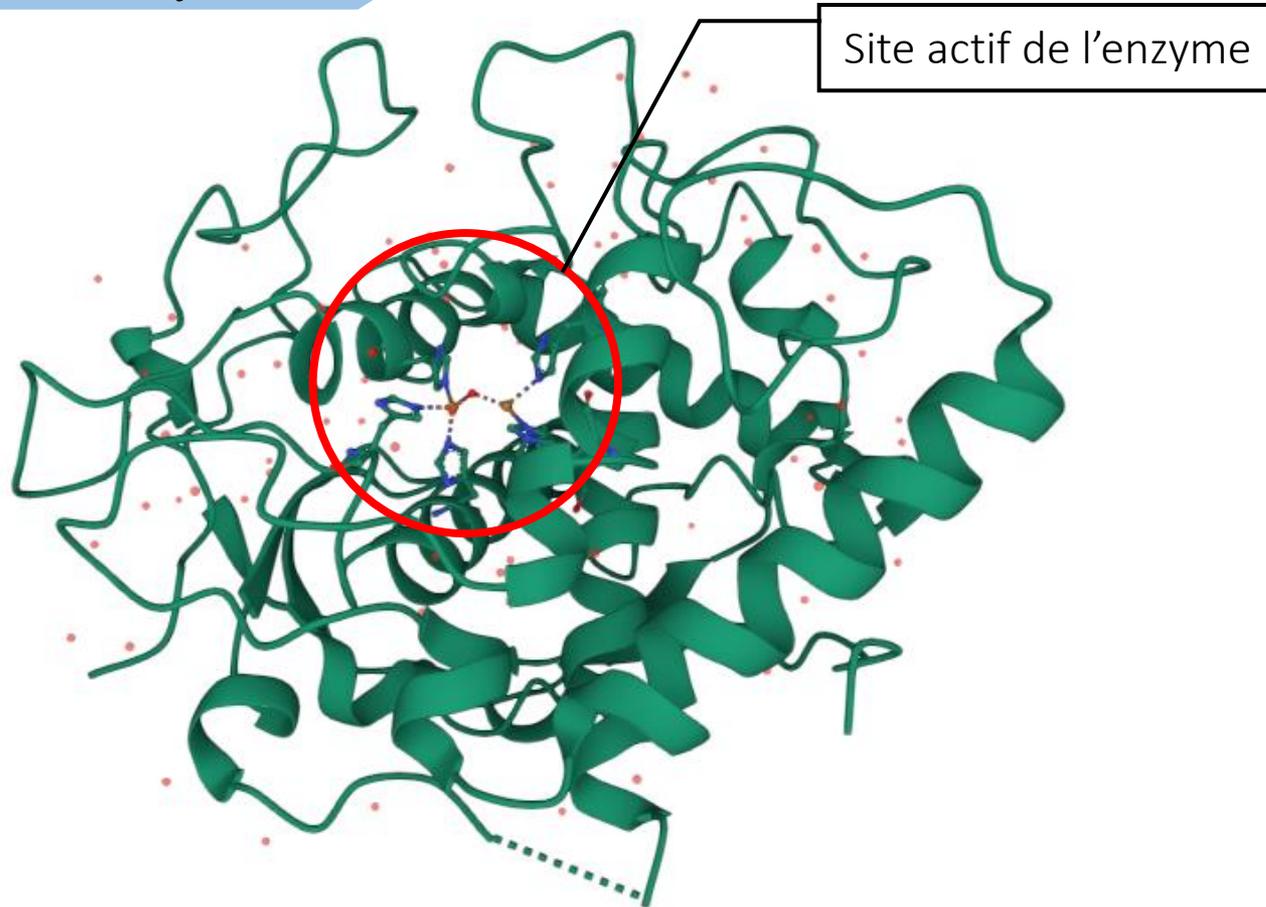


1/pente en fonction de $1/[S]_0$
Vinhibiteur = 0,5 mL



Annexes

La polyphénol oxydase



Source : <https://www.rcsb.org/3d-view/1BT1/1>