

## B32 : Cinétique enzymatique

Juin 2013 Session 2

### CONSIGNES :

***Pour cette épreuve aucun document n'est autorisé. La calculatrice programmable est interdite.***

*Vous devez respecter les méthodes données en travaux dirigés. Vos graphiques doivent comporter toutes les données qui ont été exigées en TD. EXPLIQUEZ CE QUE VOUS FAITES !*

*Rédaction : les abréviations de toute sorte sont interdites (-0,5 par abréviation). Vous devez faire des phrases : sujet/verbe/complément.*

*Equations de droites : Les données ici sont « parfaites », une vraie droite moyenne n'est pas exigée. Calculez vos équations de droite en n'utilisant que deux points pour la pente et un seul pour l'ordonnée à l'origine. Le  $r^2$  de chacune de ces droites est 0,9999999.*

La  $\beta$ -galactosidase est une enzyme fortement répandue de la biosphère qui permet la dégradation du lactose en galactose et glucose. Certaines personnes présentent une forte intolérance au lactose et sont donc totalement incapables de digérer le lait. Il serait intéressant de produire du lait à faible teneur en lactose pour ces individus. Pour cela, il faudrait trouver une  $\beta$ -galactosidase qui fonctionne dans les conditions physico-chimiques et biologiques du lait.

#### 1. Définitions

- expliquez l'état stationnaire
- définissez l'activité enzymatique

#### 2. Différentes $\beta$ -galactosidases

Le pH du lait est légèrement acide à cause de la présence d'acide lactique produit par les bactéries lactiques présentes dans le lait. Normalement ces bactéries sont détruites par le processus de pasteurisation mais on peut montrer que, pasteurisé ou non, le pH du lait peut passer d'une valeur normale de l'ordre de 6,2 à une valeur de 4,5. Selon les organismes considérés, les  $\beta$ -galactosidases ont un optimum de pH variable. Par exemple, la  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* a un optimum de pH à 4,5 alors que celle de *E.coli* a un optimum de pH à 7,5. De plus, chaque  $\beta$ -galactosidase a des caractéristiques cinétiques et des réactions aux inhibiteurs différentes.

a. Parmi les nombreux types de  $\beta$ -galactosidases que je possède dans mon laboratoire, deux échantillons ne sont pas annotés et il me manque l'échantillon correspondant à la  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* et à celle de *E.coli*.

*Proposez une méthode pour identifier les deux tubes basée sur les connaissances acquises en travaux pratiques. (la question bonus qui rapporte !)*

b. Afin de tester l'efficacité de mes différents types de  $\beta$ -galactosidases dans le lait, je réalise une étude cinétique classique de la  $\beta$ -galactosidase en remplaçant le tampon par du lait. Les résultats pour de l'étude cinétique pour la  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* sont présentés ci-dessous.

(pNPG) mmol/L	0,05	0,15	0,2	0,3	0,4	0,5
vi en nmole de S transformés/s	0,143	0,302	0,354	0,418	0,460	0,494

**Tableau 1 : Résultat de l'étude cinétique de la  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus oryzae*.** La concentration en enzyme est de 0,05 nmol/L. Le  $r^2$  est de 0,999.

Analysez ces données cinétiques.

c. Le tableau ci-dessous vous donne les résultats obtenus pour les  $\beta$ -galactosidases d'autres organismes au cours de la même expérience. *Quelle enzyme choisiriez-vous pour éliminer le lactose du lait ? Ce résultat est-il étonnant ?*

Origine de l'enzyme	pH optimum	$K_M$ (pNPG) En mmol/L	$k_{cat}$ (pNPG) en $s^{-1}$
<i>Aspergillus oryzae</i>	4,5		
<i>E.coli</i>	7,5	0,04	400
<i>Lactobacillus casei</i>	6,7	0,001	1000
<i>Streptococcus thermophilus</i>	9	7	15

**Tableau 2 :** Paramètres cinétiques de la dégradation du pNPG par différentes  $\beta$ -galactosidases dans le lait.

### 3. pH ou inhibiteurs ?

Les paramètres cinétiques obtenus pour la  $\beta$ -galactosidase d'*Aspergillus oryzae* sont beaucoup plus faibles que ceux attendus au pH du lait. Nous soupçonnons la présence d'inhibiteurs de cette  $\beta$ -galactosidase dans le lait. Pour tester cette hypothèse, nous réalisons l'étude cinétique de la  $\beta$ -galactosidase dans son tampon optimum mais en présence de lait à différentes concentrations en % volume/volume (1% v/v = 1mL dans 100mL). Les résultats sont présentés dans les figures ci-dessous.

Analysez les résultats.

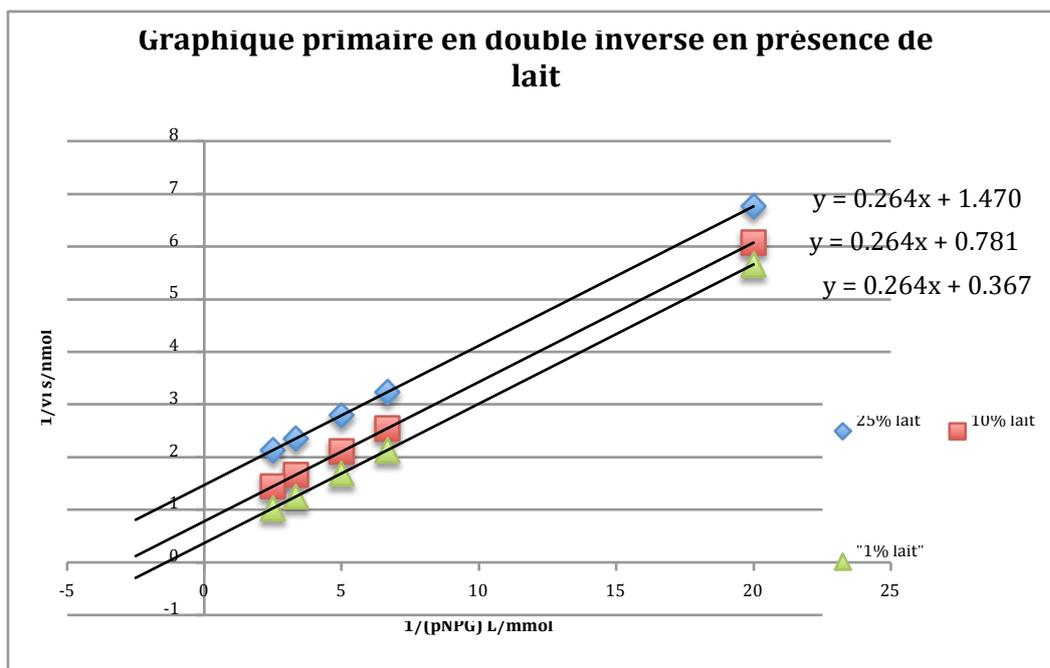


Figure 1 : Etude cinétique en présence de différentes concentrations en lait (1, 10 et 25%v/v)

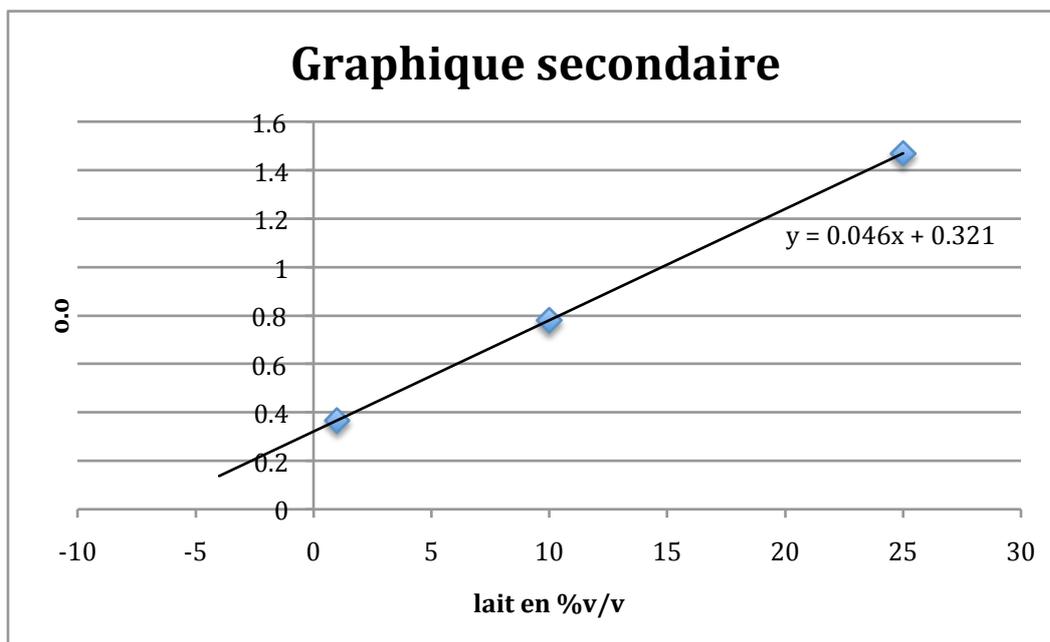


Figure 2 : Graphique secondaire: ordonnée à l'origine du graphique primaire en fonction de la concentration en lait.