

AT 09

Etude de la β -galactosidase

Le lactose est le principal sucre du lait, on ne le trouve que dans le lait et ses produit dérivés. Pour être digéré une enzyme est nécessaire, la lactase appelé aussi β -galactosidase. La lactase, normalement produite par l'intestin, décompose le lactose provenant de l'alimentation en deux autres sucres (glucose et galactose), qui peuvent être facilement absorbés par l'intestin. Les personnes intolérantes au lactose ne produisent pas assez de lactase pour digérer correctement le lactose.

Les industries de l'agro-alimentaire ont donc mis au point des laits dé lactosés en utilisant la β -galactosidase extraite de micro-organisme.

L'objectif de cet AT est d'étudier cette enzyme. Pour ce faire, il faut tout d'abord connaître les conditions physicochimiques dans lesquelles l'activité catalytique de l'enzyme est maximale. À cette fin, on dispose d'une solution de β -galactosidase et d'une solution d'orthonitrophényl- β -D-galactoside (oNPG), substrat de l'enzyme. Ainsi, le coefficient d'extinction molaire de l'oNP puis les conditions optimales de fonctionnement de l'enzyme (pH, température) sont déterminés.

Across the Channel



spectre \rightarrow spectrum
 tracer une courbe \rightarrow to draw a curve
 température ambiante \rightarrow room temperature
 tampon phosphate \rightarrow phosphate buffer
 travailler en binôme \rightarrow work in pairs
 temps de préchauffage \rightarrow preheating time
 blanc réactif \rightarrow reagent blank / blank

JOUR 1 :

RÉFLÉXION PRÉLIMINAIRE

Activité 1 : Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'oNP

Q1. À partir du **document 1**, déterminer la longueur d'onde d'absorption maximale λ_{\max} que l'on utilisera dans la suite des manipulations pour détecter l'oNP sans détecter l'oNPG.

Q2. Compléter le tableau de la **fiche technique 1**. Détailler entièrement un calcul (équations aux grandeurs + aux unités) pour la détermination de la quantité d'oNP par tube et pour la détermination de la concentration en oNP par rapport au volume total.

Q3. À partir de la loi de Beer Lambert, expliquer à quoi correspond la pente de la droite : $A = f(C_{(oNP, \text{volume total})})$ puis expliquer l'intérêt de réaliser la manipulation présentée dans la **fiche technique 1**.

RÉALISATION PRATIQUE

M1. Réaliser la détermination du coefficient d'extinction molaire (ϵ) de l'oNP à partir de la **fiche technique 1**.

PRÉSENTATION ET EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Activité 1 : Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'oNP

Q4. Tracer la courbe : $A = f(C_{(oNP, \text{volume total})})$.

Q5. En déduire la valeur du coefficient d'extinction molaire de l'oNP. Exprimer le résultat d'abord en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ puis ensuite en $m^2 \cdot mol^{-1}$.

JOUR 2 :

RÉFLEXION PRÉLIMINAIRE

Activité 2 : Détermination de la température optimale d'activité enzymatique

Q6. Préciser la composition et le rôle du tube n°6 (fiche technique 2).

Activité 3 : Détermination du pH optimum d'activité enzymatique

Q7. Expliquer, à l'aide des connaissances, pourquoi l'enzyme est inactive pour un pH égal à 11.

RÉALISATION PRATIQUE

M2. Réaliser en binôme la détermination de la température optimale d'activité enzymatique à l'aide de la **fiche technique 2**.

M3. Réaliser en binôme la détermination du pH optimum d'activité enzymatique à partir de la **fiche technique 3**.

PRÉSENTATION ET EXPLOITATION DES RÉSULTATS

Activité 2. Détermination de la température optimale d'activité enzymatique

Q8. Déterminer, à l'aide de la **fiche technique 2**, pour chaque condition de température, la quantité d'oNP produit en micromoles par min, en utilisant la loi de Beer Lambert et la valeur du coefficient d'extinction molaire de l'oNP déterminé précédemment.

Q9. Reporter les résultats d'absorbance et les valeurs calculées dans un tableau puis construire le graphique « *quantité d'oNP produit par minute en fonction de la température* ».

Q10. En déduire la température optimale de la β -galactosidase.

Activité 3. Détermination du pH optimum d'activité enzymatique

Q11. Déterminer pour chaque condition de pH la quantité d'oNP produit en micromoles par min, en vous aidant de la **fiche technique 3**.

Q12. Reporter les résultats d'absorbance et les valeurs calculées dans un tableau puis construire le graphique « *quantité d'oNP produit par minute en fonction du pH* ».

Q13. En déduire le pH optimal de la β -galactosidase.

Conclusion

Q14. A partir des éléments obtenus, indiquer les conditions optimales de fonctionnement de la β -galactosidase puis proposer une adaptation des protocoles pour déterminer plus précisément les conditions optimales de la réaction enzymatique.

Fiche technique 1 : Détermination du coefficient d'extinction molaire de l'oNP

La valeur du coefficient d'extinction molaire de l'oNP sera utilisé pour déterminer la quantité d'oNP produite, et donc celle d'oNPG utilisée, lors de plusieurs manipulations portant sur l'étude de l'activité de la β -galactosidase.

- À partir de la solution étalon de 2-nitrophénol (oNP) à 1 mmol.L^{-1} , préparer une gamme d'étalonnage en respectant les indications données dans le tableau ci-dessous.

- Mesurer ensuite les absorbances à λ_{max} .

N° des tubes	0	1	2	3	4
oNP à 1 mmol.L^{-1} (mL)	0	0,125	0,250	0,375	0,5
Eau distillée (mL)	0,5	0,375	0,250	0,125	0
Tampon phosphate-Mg ²⁺ – β mercapto éthanol – pH 7 (mL)	1	1	1	1	1
Na ₂ CO ₃ à 1 mol.L^{-1} (mL)	1	1	1	1	1
Quantité d'oNP (μmol)	0	0,125	0,250	0,375	0,5
C _(oNP, volume total) (mol.L^{-1})	0	5×10^{-5}	1×10^{-4}	$1,5 \times 10^{-4}$	2×10^{-4}
A (à $\lambda_{\text{max}}^{\text{MS}}$ nm)	0	0,170	0,353	0,545	0,741

Fiche technique 2 : Détermination de la température optimale d'activité enzymatique

L'enzyme est inactive à pH 11. Il est donc possible d'arrêter la réaction à un moment précis en modifiant le pH par ajout d'une quantité adaptée de Na₂CO₃. On choisit de fixer arbitrairement le pH à 7 en utilisant une solution d'oNPG tamponnée.

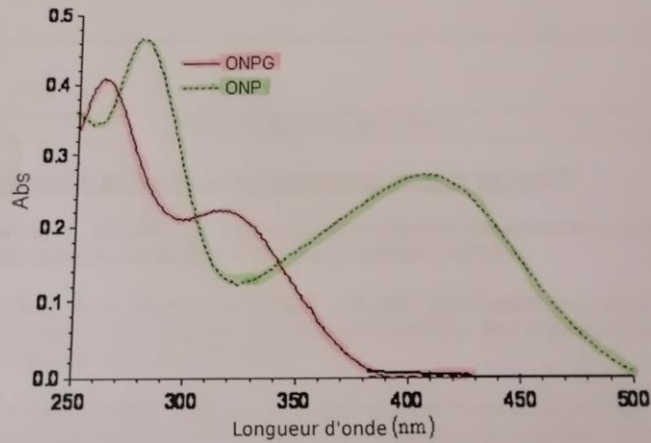
- Mesurer la température de la pièce.
- Introduire exactement 1,4 mL d'oNPG à $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ (pH = 7) dans 6 tubes numérotés de 1 à 6.
- Mettre le tube n°1 dans la glace ($0 \text{ }^\circ\text{C}$)
- Préchauffer 3 tubes dans des bains marie à $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ et laisser le 5^e et le 6^e à température ambiante pendant au moins 5 minutes.
- Ajouter 100 μL de solution enzymatique de β -galactosidase dans le premier tube (t=0), puis de même 20 secondes **exactement** plus tard dans le tube n°2, et ainsi de suite toutes les 20 secondes jusqu'au tube n° 5. Ajouter (20 secondes plus tard) 100 μL de tampon phosphate dans le tube n°6. Bien homogénéiser chaque tube immédiatement.
- A t = 2 min **exactement** ajouter 1 mL de Na₂CO₃ à 1 mol.L^{-1} dans le premier tube, puis de même dans les autres tubes toutes les 20 secondes exactement de façon à ce que le temps de réaction soit de 2 min pour chaque tube. Bien homogénéiser chaque tube immédiatement.
- Lire les absorbances à λ_{max} .

Fiche technique 3 : Détermination du pH optimum d'activité enzymatique

On travaillera à la température déterminée comme permettant une activité enzymatique maximale et on fera varier le pH en utilisant des solutions d'oNPG tamponnées à pH = (5, 6, 7, 8 et 9).

- Introduire exactement 1,4 mL d'oNPG à 2,5 mmol.L⁻¹ (pH croissant) dans 5 tubes numérotés de 1 à 5. Réaliser un 6^e tube avec 1,4 mL d'oNPG à pH=7.
- Préchauffer les 6 tubes dans un bain marie à la température déterminée pendant au moins 5 minutes.
- Ajouter 100 µL de solution enzymatique de β-galactosidase dans le premier tube (t=0), puis de même 20 secondes **exactement** plus tard dans le tube n° 2, et ainsi de suite toutes les 20 secondes jusqu'au tube n° 5. Ajouter (20 secondes plus tard) 100 µL de tampon phosphate dans le tube n° 6. Bien homogénéiser chaque tube immédiatement.
- A t = 2 min **exactement** ajouter 1 mL de Na₂CO₃ à 1 mol.L⁻¹ dans le premier tube, puis de même dans les autres tubes toutes les 20 secondes exactement de façon à ce que le temps de réaction soit de 2 min pour chaque tube. Bien homogénéiser chaque tube immédiatement.
- Lire les absorbances à λ_{max}.

Document 1 : Spectres d'absorption de l'oNPG et de l'oNP



Document 2 : Action de la β-galactosidase sur le lactose et l'oNPG

