

**Éléments de correction, TP1 Les enzymes des catalyseurs spécifiques****Activité 1 : Les enzymes, des protéines spécifiques****Étape 1 : proposition d'une démarche cohérente :**

- **pb** : On cherche à montrer qu'une enzyme est spécifique d'un substrat donc n'agit que sur un seul substrat.
- **Pertinence, cohérence** : il faut mettre l'enzyme en présence de substrat, dans des conditions où elle doit être active.
- **Rigueur** : Il faut pour cela comparer différentes conditions :

- Il faut les différents tubes tests T1, T2, T3 qui contiennent les différents substrats (solution de diosides : Saccharose, Maltose, Lactose) avec l'enzyme saccharase contenue dans le filtrat.

Cette réaction enzymatique produit du glucose détectable par les « bandes test ». Si le test est positif, le glucose provient de l'hydrolyse du dioside, la levure utilise le dioside correspondant en l'hydrolysant.

- des témoins : tubes à essais contenant l'enzyme seule (T4) et seulement les substrats sans enzymes (T5, T6 et T7). Ceci permet de vérifier qu'il n'y a pas formation du produit (glucose) si la condition E+S n'est pas présente.

Pour que l'expérience soit rigoureuse, on doit mettre tous les tubes dans les conditions identiques où l'enzyme est efficace (37°C, pH neutre, 10 minutes) et procéder à la même dilution du substrat : il faudra remplacer le volume de solution d'enzyme par le même volume d'eau distillée dans les tubes témoins afin d'avoir toujours un même volume final. Enfin il faudra comparer les tubes tests avec les tubes témoins.

**Résultats attendus :**

Si l'enzyme est spécifique de son substrat, seul dans le tube contenant saccharase et saccharose on obtiendra l'hydrolyse du saccharose et donc la présence de sucre simple comme le glucose, mis en évidence par un glucotest.

S'il n'y a pas spécificité, on observera de l'hydrolyse (donc une présence de glucose) dans d'autres tubes avec d'autres substrats.

Les tubes témoins : il n'y aura pas de présence de sucre simples car pas d'hydrolyse.

**Étape 2 : Réalisation de la manipulation :**

Manipulation : pas de précaution de sécurité particulière, par contre les tubes doivent être marqués, différentes pipettes doivent être utilisées, les volumes et les temps respectés, les glucotests correctement réalisés.

**Étape 3 : présentation des résultats :**

Tableau présentant les résultats de la mise en évidence de la formation de glucose lors de l'hydrolyse de diosides avec la saccharase :

tube	Contenu du tube (3 ml de chaque réactif)	Résultat du test au glucose (glucotest initial)	Résultat du test au glucose (glucotest après 10 min à 37°C)	Présence de glucose due à l'hydrolyse d'un dioside
1S	Filtrat+Saccharose	-	+	+
2M	Filtrat +Maltose	-	-	-
3L	Filtrat+Lactose	-	-	-
4 témoin	Filtrat+ eau	-	-	-
5 témoin	Saccharose+eau	-	-	-
6 témoin	Lactose+eau	-	-	-
7 témoin	Maltose+eau	-	-	-

+ : Présence de glucose - : absence de glucose.

Les témoins 4 à 7 sont réalisés au bureau (filtrat +eau distillée et les trois sucres diosides + eau distillée)

**Étape 4 : Interprétation des résultats**

On observe que seule le tube contenant de la saccharase et du saccharose a permis la formation de glucose, pas de glucose obtenu avec le maltose ou le lactose en présence de la saccharase. L'enzyme seule ou les substrats seuls ne permettent pas l'hydrolyse du substrat (tubes témoins).

On en déduit que le saccharose a été hydrolysé en glucose grâce à l'action de la saccharase. La saccharase ne peut pas agir sur les autres substrat : lactose et maltose. On en déduit que l'enzyme saccharase est spécifique du substrat Saccharose.

Quelle propriété concernant l'activité enzymatique du filtrat est ainsi mise en évidence ?

L'action enzymatique du filtrat ne peut s'exercer que sur le saccharose pour réaliser son hydrolyse. Elle est **spécifique de ce substrat** (elle ne peut hydrolyser le lactose et le maltose.)

Saccharose + eau → glucose + fructose

**De façon plus générale, les enzymes sont toujours spécifiques d'un substrat particulier.**

**Activité 2 : Variations de l'activité enzymatique**

A partir de l'animation (diastase2 en ligne), écrire la réaction catalysée par cette enzyme



S : lactose et eau,

E=lactase,

P = galactose et glucose

Préciser le type de réaction chimique réalisé.

Hydrolyse : dissociation d'une molécule par coupure d'une liaison covalente en présence d'une molécule d'eau (ici par une lactase).

**a) Effet de la température**

1) Quel est l'effet de la température sur la quantité de produit formé ? (Maintenir les autres paramètres à pH=7, E=10, S=50, Autre=0)

Tableau des observations, pH7, E=10, S=50, autre=0 :

Température de la réaction (°C)	Observation au niveau moléculaire
0	l'enzyme est complètement inactive, pas d'hydrolyse
20	réaction correcte
40	la réaction est beaucoup plus rapide
60	Des enzymes sont dénaturées : forme de l'enzyme perdue
90	Toutes les molécules d'enzyme sont dénaturées (irréversible si on redescend la température à 37°C, la forme initiale n'est pas récupérée)

La quantité de produit formé augmente avec la température (à partir de zéro) jusqu'à un optimum puis diminue au-delà de 50/60°C, l'enzyme est dénaturée irréversiblement pour de fortes températures.

La température est responsable de l'agitation des molécules. Lorsque la température augmente, l'agitation des molécules aussi et ceci augmente les chances, la probabilité de rencontre des molécules enzyme/substrat

**b) Effet du pH**

1) Quel est l'effet du pH sur la quantité de produit formé ? ( Maintenir les autres paramètres à T= 20°C , E = 10, S = 50, autre = 0)

Tableau des observations, t°= 20°C, E=10, S=50, autre=0 :

pH de la réaction	Observation au niveau moléculaire
1	fort pourcentage de molécules d'enzyme dénaturées et lactase++(ionisé ++), on n'observe pas de réaction d'hydrolyse
4	faible pourcentage d'enzyme dénaturée, lactose+, peu de réaction d'hydrolyse
8	aucune dénaturation, lactose non ionisé, réaction fonctionnelle
11	petit pourcentage d'enzyme dénaturée, lactose- (ionisé-)
13	enzymes toutes dénaturées, lactose-, pas de réaction

La quantité de produit formé augmente avec le pH jusqu'à un optimum vers pH=7 puis diminue au-delà. L'enzyme est dénaturée irréversiblement pour des pH très acides ou basiques.

Le pH modifie les charges portées par les acides aminés de la molécule protéique donc entraîne une modification de sa conformation spatiale (donc perte d'activité).

**c) Effet de la présence d'une substance : le thiolactose**

pH = 7 , T= 20°C , E = 10, S = 50

A l'aide du logiciel , observer la vitesse de la réaction (sur une min) en absence de thiolactose (Autre = 0) puis en présence de thiolactose ( Autre = 50).

Résumer en une phrase votre constatation :

La molécule de thiolactase occupe les sites enzymatiques sans être hydrolysée. L'enzyme est alors moins disponible pour réaliser l'hydrolyse du lactose.

Le thiolactose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>S) est une molécule très proche du lactose ( C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>).

La forme moléculaire des 2 substances étant très proche, la thiolactase se fixe sur le site de l'enzyme.

Reconnaissance spatiale enzyme/substrat par la partie commune des 2 molécules mais ensuite l'enzyme ne peut être active et hydrolyser.

- La forme d'une protéine enzymatique détermine son activité
- Les conditions du milieu modifient la structure tridimensionnelle ou mutation ADN modifie a du site actif, modifie forme molécule