

**BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR
BIOTECHNOLOGIES**

*ÉPREUVE E5 :
Travaux pratiques de biotechnologies*

Durée de l'épreuve : 8 heures
Coefficient : 4

**SOUS-ÉPREUVE U.52
TRAVAUX PRATIQUES DE BIOCHIMIE STRUCTURALE ET
FONCTIONNELLE DES PROTÉINES**

*Durée de la sous-épreuve : 2 H 00
Coefficient : 1*

Le sujet comporte 5 pages numérotées de 1/5 à 5/5

**L'utilisation de la calculatrice est autorisée.
Outil informatique à disposition.**

Comparaison des caractéristiques fonctionnelles de l'enzyme produite par génie génétique et de l'enzyme d'origine sauvage

Une enzyme obtenue par génie génétique appelée « LYC » est produite et libérée dans un milieu de fermentation, à partir d'une souche d'*Escherichia coli* recombinante.

Les paramètres cinétiques de l'enzyme « LYC » seront à déterminer pour être comparés aux résultats obtenus pour l'enzyme d'origine sauvage.

L'ensemble du travail portant sur la détermination de l'activité enzymatique sera réalisé sur un extrait protéique de milieu de fermentation.

1. Préparation d'un tampon phosphate à utiliser pour l'étude de l'enzyme « LYC »

1.1. Réactifs et matériel

- Solution de KH_2PO_4 à 1 mol.L^{-1}
- Solution de K_2HPO_4 à 1 mol.L^{-1}
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en poudre (MM : $203,3 \text{ g.mol}^{-1}$)
- pHmètre étalonné + acide et base concentrés pour ajustement du pH du tampon
- Fiole de 500 mL
- Verrerie classique de laboratoire

1.2. Mode opératoire



Caractéristiques du tampon	Travail à réaliser
Concentration molaire en MgCl_2 : $1,5 \text{ mmol.L}^{-1}$	Peser la quantité nécessaire de MgCl_2
Concentration molaire de la solution tampon : $C \text{ mmol.L}^{-1}$	<ul style="list-style-type: none">• 15 mL de solution de KH_2PO_4• 10 mL de K_2HPO_4
pH 7	pH à mesurer et à ajuster
Solvant : eau distillée Volume de tampon à préparer : 500 mL	Après ajustement du pH, compléter à 500 mL

1.3. Compte rendu

- Présenter et justifier le calcul de la masse de MgCl_2 à peser
- Calculer la concentration molaire du tampon phosphate (C).

2. Détermination des paramètres cinétiques

2.1. Réactifs et matériel

- Extrait de milieu de fermentation contenant l'enzyme surexprimée, noté « LYC ».	
- Substrat chromogène, noté « S » à 10 mmol.L ⁻¹ .	 SGH09
- Tampon phosphate précédemment préparé	
- Solution d'arrêt : Na ₂ CO ₃ 1 mol.L ⁻¹	 SGH05
- Bain thermostaté à 37°C.	
- Chronomètre	
- Pipettes automatiques de 100 µL, 1000 µL + cônes adaptés	

À partir des informations données par les pictogrammes apparaissant ci-dessus, indiquer sur l'annexe U52-1, le comportement à adopter pendant la manipulation.

L'annexe U52-1 sera à donner à un examinateur avant le début de la manipulation.

2.2. Mode opératoire

Dans une série de 11 tubes à essai introduire :

- Substrat x mL*
- Eau distillée..... (0,9-x) mL
- Tampon phosphate pH7..... 2 mL

Préincuber 5 minutes à 37°C

- Ajouter l'enzyme « LYC »..... 0,1 mL

Homogénéiser

Incuber à 37°C pendant 5 min exactement.

- Ajouter la solution d'arrêt 2 mL

Lire l'absorbance à 420 nm contre le blanc réactif.

* Déterminer x de manière à avoir une gamme de concentration en substrat de 0 à 3 mmol.L⁻¹ de milieu réactionnel.

2.3. Compte rendu

- Déterminer les constantes cinétiques K_M en mmol.L^{-1} et V_{\max} en $\Delta A.\text{min}^{-1}$.
- Comparer les valeurs obtenues à celles de l'enzyme d'origine sauvage.
- Conclure sur l'efficacité de l'enzyme.

Données :

□ $\epsilon_S = 5000 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$.

□ Paramètres cinétiques de l'enzyme d'origine sauvage :



- $K_M : 0,34 \text{ mmol.L}^{-1}$
- $V_{\max} : 0,16 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ de milieu réactionnel.min}^{-1}$

Annexe U52-1

À compléter et à rendre avant la manipulation

Rappeler la signification des pictogrammes du tableau du paragraphe 2.1.
En déduire le comportement à adopter par rapport aux produits signalés.

Remarque : les pictogrammes qui apparaissent sont ceux qui correspondent au nouvel étiquetage des produits chimiques, la correspondance avec l'ancien étiquetage peut être consultée dans la salle.

Produits signalés	Pictogramme	Signification du pictogramme	Comportement à adopter
Substrat chromogène, noté « S » à 10 mmol.L ⁻¹ .	 SGH09		
Solution d'arrêt : Na ₂ CO ₃ 1 mol.L ⁻¹	 SGH05		