

Activité 6 - Les enzymes, des biomolécules catalytiques

On veut mettre en évidence les particularités moléculaires des enzymes qui leur assurent leur fonction catalytique.

Chaque seconde, plusieurs centaines de milliers de réactions chimiques ont lieu dans une cellule. Depuis longtemps l'industrie utilise des catalyseurs pour accélérer des réactions chimiques. La catalyse est l'action par laquelle une substance (appelée catalyseur) accélère une réaction chimique. Dans notre organisme ce sont les catalyseurs biologiques qui agissent dans nos cellules : ce sont des protéines, les enzymes. Cependant, certains paramètres peuvent impacter l'activité de ces dernières. Alors nous pouvons nous demander si les conditions du milieu influencent l'activité enzymatique.

Quelle est l'influence de la température sur l'activité d'une enzyme ? Nous allons dans un premier temps expliquer le principe du protocole de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon. Puis nous allons exploiter et critiquer les résultats obtenus et leur conformité aux attentes. **B**

L'hydrolyse enzymatique est un processus qui joue un rôle important dans la digestion des aliments. C'est la rupture d'une liaison covalente par action d'une molécule d'eau. Le protocole met en évidence l'influence de deux paramètres, la température et le pH, sur l'activité d'une enzyme durant l'hydrolyse de l'amidon, ici nous nous intéressons à la température.

Plusieurs tubes sont nécessaires, chacun remplissant une fonction et correspondant à des situations différentes :

Le Tube 1 est une expérience témoin, ce sont les conditions optimales, correspondant à celles du corps humain (35°C et en présence d'enzymes). C'est le témoin positif qui permet de vérifier que l'expérience soit bien "fonctionnelle". (et l'enzyme !)

Le Tube 2 est une expérience test, qui cette fois-ci ne contient pas d'enzyme. Il permet de s'assurer que la réaction du Tube 1 est due à la présence d'enzyme.

Le Tube 3 est l'expérience témoin du Tube 4 avec une température plus basse (5°C) mais en étant toujours en présence de l'enzyme.

Le Tube 4 permet de savoir si la réaction du Tube 3 est due à la présence d'enzymes tout en étant dans les mêmes conditions (5°C).

Le Tube 5 est une expérience test qui permet de savoir s'il y a une réaction lorsque les enzymes sont préalablement chauffées.

Chaque tube à essai contient donc de l'amidon. Afin de vérifier la présence de ce dernier nous utilisons un réactif coloré. Nous effectuons donc un premier prélèvement à t_0 sans l'enzyme et nous ajoutons quelques gouttes de Lugol, ce réactif coloré permet de mettre en évidence une autre substance, ici l'amidon. La réaction caractéristique du Lugol en présence d'amidon est une coloration noire (bleue foncé).

Ensuite, toutes les minutes (pendant 6 minutes) nous prélevons quelques gouttes de chacun des 5 tubes. Faire plusieurs prélèvements permet de savoir à quel moment la réaction a lieu, étant donné que cette dernière est très rapide. Nous ajoutons du Lugol dans les échantillons prélevés sur la plaque de titration.

Enfin, nous mettons en évidence la présence éventuelle de produit dans les tubes. Nous utilisons des bandelettes réactives, elles ont la même fonction que la liqueur de Fehling, qui réagissent lors de la présence d'un sucre simple. La réaction caractéristique de la liqueur de Fehling en présence de sucre simple est une coloration rouge orangé.

Ces deux **acides**, qui sont des réactifs colorés, servent à déterminer la présence de glucides : l'amidon pour le lugol et un sucre simple pour la liqueur de Fehling.

tube n°	1	2	3	4	5
contenu des tubes	- 10 mL d'empois d'amidon (= substrat) - 1 mL de solution d'amylase (=enzyme)	- 10 mL d'empois d'amidon - 1 mL d'eau	- 10 mL d'empois d'amidon - 1 mL de solution d'amylase	- 10 mL d'empois d'amidon - 1 mL d'eau	- 10 mL d'empois d'amidon - 1 mL de solution d'amylase chauffée au préalable
température (en °C)	35	35	5	5	35

Tableau du protocole, avec comme paramètre étudié la température

Les réactions chimiques se déroulent généralement dans des conditions de températures particulières. L'activité enzymatique serait modifiée par la température du milieu. Si cela est vrai, nous devrions déterminer une température idéale pour chaque réaction enzymatique, car en effet ici la réaction se déroule dans le corps, qui a une température très précise : toute valeur différente des valeurs optimales perturberont le bon déroulement de la réaction.

Nous obtenons les résultats suivants :

Dans le tube 1, l'amylase réagit au bout de la 3ème minute. La couleur change (du bleu foncé à du brun-rouge) cela signifie qu'il n'y a plus de Lugol, une réaction a eu lieu et un produit s'est formé. On peut en déduire que cela est dû aux conditions optimales, c'est à dire une température proche de celle du corps humain.

Dans le tube 2, l'amylase ne réagit pas, il n'y a pas de réaction. La couleur ne change pas (bleu foncé), cela signifie qu'il y a toujours de l'amidon. On peut en déduire que cela est dû à l'absence d'enzyme.

Dans le tube 3, l'amylase ne réagit pas, il n'y a pas de réaction. La couleur ne change pas, cela signifie qu'il y a toujours de l'amidon. On peut en déduire que cela est dû à la température est trop basse, moins de 5°C.

Dans le tube 4, l'amylase ne réagit pas, il n'y a pas de réaction. La couleur ne change pas, cela signifie qu'il y a toujours de l'amidon. On peut en déduire que cela est dû à la température est trop basse, moins de 5°C, mais également à l'absence d'enzyme.

Dans le tube 5, l'amylase ne réagit, il n'y a pas de réaction. La couleur ne change pas, cela signifie qu'il y a toujours de l'amidon. On peut en déduire que cela est dû à l'enzyme qui a été chauffée au préalable. Elle est dénaturée et la réaction chimique qui se déroule quand la cellule est vivante s'arrête. **TB**

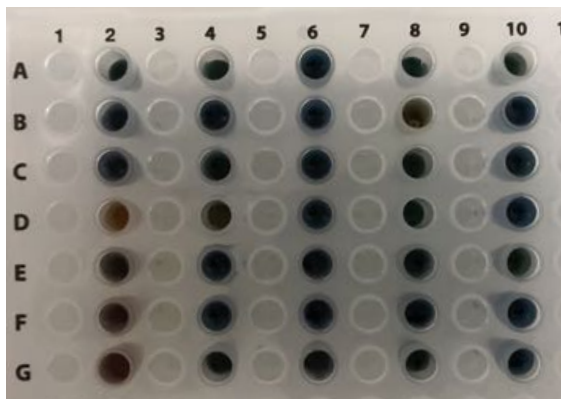


Photo de la plaque de titration contenant les prélèvements des 5 tubes, avec le lugol ajouté

t_0 =ligne A
tube 1=colonne 2
tube 2=colonne 4
tube 3=colonne 6
tube 4=colonne 8
tube 5=colonne 10



Photo des bandelettes réactives après avoir été mises dans les tubes
bandelettes réactives des tubes 1 à 5 (de haut en bas)

Par ailleurs lorsque nous avons utilisé les bandelettes réactives dans les tubes afin de détecter une potentielle présence de sucre simple, toutes les bandelettes étaient négatives. Ce résultat n'est pas cohérent car le tube 1 était dans des conditions optimales et une réaction a bien eu lieu. La bandelette n'aurait pas dû être négative car un réactif est censé avoir été formé. Le sucre simple maltose aurait provoqué un changement de couleur de la bandelette. **exact**

Lorsque la température est trop élevée ~~alors la solution d'amylase est en ébullition~~, cela fait perdre définitivement les propriétés catalytiques à l'enzyme : il y a dénaturation. Quand la température est trop basse, le froid (3°C) inhibe les propriétés de l'enzyme (perte provisoire des propriétés catalytiques de l'enzyme). Sa présence est indispensable à la synthèse d'amidon. Les enzymes sont des protéines possédant une structure très particulière, elles possèdent un site actif. Il s'agit de la partie de la molécule qui se lie au substrat et/ou réalise la réaction chimique. On appelle site actif l'ensemble site de fixation et site catalytique. Toutes modifications de l'environnement entraînent l'absence du fonctionnement de l'enzyme. Elle va former un complexe enzyme-substrat, ici il s'agit de l'amylase et de l'amidon. Ensuite, la réaction s'active, l'amidon se transforme en glucose. Puis, le produit, donc le glucose, se "libère", le complexe amylase/ amidon est rompu. Ainsi les résultats que nous avons obtenus sont cohérents.

Pour conclure, l'hydrolyse enzymatique de l'amidon qui correspond à la réaction : $R + S + E \rightarrow P + E$

R=réactif (H_2O) P=produit (maltose) S=substrat (amidon) E=enzyme (amylase)

L'amidon s'est dégradé et le maltose s'est formé. Dans notre expérience nous avons mis en évidence l'influence d'un paramètre : la température. En changeant les conditions de l'hydrolyse, c'est-à-dire : ne pas ajouter d'enzyme, baisser la température du tube (3°C), baisser la température ET ne pas mettre d'enzyme, ou encore chauffer l'enzyme au préalable ; nous avons pu par l'observation et l'interprétation des résultats en venir à une conclusion. Notre hypothèse est vérifiée : les réactions chimiques se déroulent dans des conditions de températures particulières. L'activité enzymatique est modifiée par la température du milieu. Les valeurs extrêmes des facteurs inhibent ou détruisent l'enzyme en agissant sur la conformité du site actif. Cette expérience nous a permis de déterminer les valeurs optimales de température de l'amylase (environ 35°C). Existe-t-il d'autres conditions particulières qui nécessitent d'être respectées ? Et ces conditions sont-elles identiques pour toutes les enzymes ? **TB**