



SERVICES CULTURE ÉDITIONS
RESSOURCES POUR
L'ÉDUCATION NATIONALE

**Ce document a été numérisé par le CRDP de Bordeaux pour la
Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel**

session 2011

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR

BIOTECHNOLOGIES

BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES PROTEINES

SESSION 2011

DURÉE DE L'ÉPREUVE : 2h
COEFFICIENT : 1

Matériel autorisé :

- dictionnaire anglais/français
- l'utilisation de la calculatrice est interdite

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 7 pages numérotées de 1/7 à 7/7

BTS BIOTECHNOLOGIES		Session 2011
Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines	Code sujet BOE3BP	Page : 1/7

Etude de l'enzyme glucose oxydase GOD ou GOx, enzyme extrait d'*Aspergillus niger*, utilisé pour le dosage enzymatique du glucose.

L'enzyme glucose oxydase a été hautement purifié pour être utilisé :

Dans le domaine de la biochimie analytique : pour doser le glucose libre aussi bien en industrie agro alimentaire qu'en laboratoire de biologie médicale pour le suivi du diabète. Le plus souvent, dans les kits de dosage du glucose, l'action de cet enzyme est couplée à une réaction catalysée par la peroxydase (POD, HRP) qui visualise la formation d'H₂O₂. Le dosage du glucose peut être aussi réalisé par des méthodes nano technologiques, avec des bio senseurs ou biocapteurs dans lesquels l'enzyme glucose oxydase est immobilisé.

Comme additif alimentaire: en boulangerie, l'enzyme rend la pâte plus ferme, remplaçant des oxydants comme le bromate et l'acide ascorbique. La glucose oxydase sert aussi à éliminer l'oxygène en emballage alimentaire, et le D-glucose du blanc d'œuf pour éviter le brunissement.

1. Etude de la structure et des propriétés de la glucose oxydase (6 points)

La glucose oxydase (β -D-glucose : O₂ oxydoreductase, EC 1.1.3.4) catalyse l'oxydation du glucose par l'oxygène pour former du peroxyde d'hydrogène et de la D gluconolactone qui est spontanément hydrolysée en acide D gluconique.

1.1. Citer les différentes classes d'enzymes.

1.2. Ecrire la réaction catalysée par la glucose oxydase : la structure développée des composés n'est pas exigée.

Le document 1 présente les caractéristiques structurales et la structure tridimensionnelle de la glucose oxydase.

1.3. Relever les caractéristiques structurales essentielles de cette protéine.

1.4. Définir le terme apo-enzyme.

La O-glycosylation affecte la thréonine et la sérine.

1.5. Schématiser une liaison O-glycosidique en faisant apparaître la structure semi développée d'un des deux amino acyls.

1.6. Donner la signification des lettres FAD et une représentation simplifiée de ce cofacteur.

1.7. Expliciter le mode d'intervention de ce coenzyme dans la réaction catalysée par la glucose oxydase.

2. Extraction et purification de la glucose oxydase (2,5 points)

Le **document 2** présente les différentes étapes et les résultats d'une purification de glucose oxydase à partir d'*Aspergillus niger*.

- 2.1 Donner les caractéristiques des phases stationnaires des chromatographies utilisées à l'étape 2 et à l'étape 4.
- 2.2 Expliquer le phénomène de précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et justifier la nécessité de dialyser la solution obtenue après solubilisation du précipité.
- 2.3 Evaluer la contribution de l'étape 2 à l'enrichissement de la solution enzymatique : calculer le facteur d'enrichissement ou le taux de purification obtenu lors de cette étape.

3. Utilisation de la GOD dans les kits de dosage du glucose (6,5 points)

Le **document 3a** présente un extrait de la fiche technique du « kit : Glucose GOD-PAD » pour le dosage du glucose dans les liquides biologiques : ce même kit est utilisé en industrie agro alimentaire notamment pour le dosage du glucose dans les milieux de fermentation.

- 3.1 Présenter le principe du dosage du glucose utilisé dans ce kit.
- 3.2 Préciser le type de méthode enzymatique utilisée. Justifier.
- 3.3 Les deux enzymes présents dans le réactif R1 ont une concentration exprimée en UI/L.
Définir cette unité.
- 3.4 Préciser le rôle des différents composants présents dans les réactifs R1, R2 et R3.

Lors de la production de biomasse de *Saccharomyces cerevisiae* à partir de la mélasse, sous produit de l'industrie sucrière, la concentration en saccharose et en glucose du milieu de fermentation est régulièrement mesurée.

Le dosage du glucose est réalisé à l'aide du kit de dosage présenté précédemment.

Le **document 3b** précise les conditions de réalisation et les résultats du dosage du glucose dans le milieu de fermentation une heure après le début de la production.

- 3.5 Sachant que la concentration de glucose dans le milieu de fermentation varie habituellement de 5 à 30 g/L au cours de la production et que l'échantillon est fortement coloré, justifier les conditions de réalisation du dosage présenté dans le **document 3b**.
- 3.6 Calculer la concentration massique en glucose dans le milieu de fermentation au temps 60 minutes (expression littérale et application numérique).

4. Utilisation de la glucose oxydase immobilisée dans l'électrode à glucose (4 points)

Le **document 4** présente un type d'électrode à glucose, l'électrode ABL 800.

Dans ce type d'électrode, la glucose oxydase est immobilisée sur une matrice carbonée à l'aide d'un agent de pontage : le glutaraldéhyde.

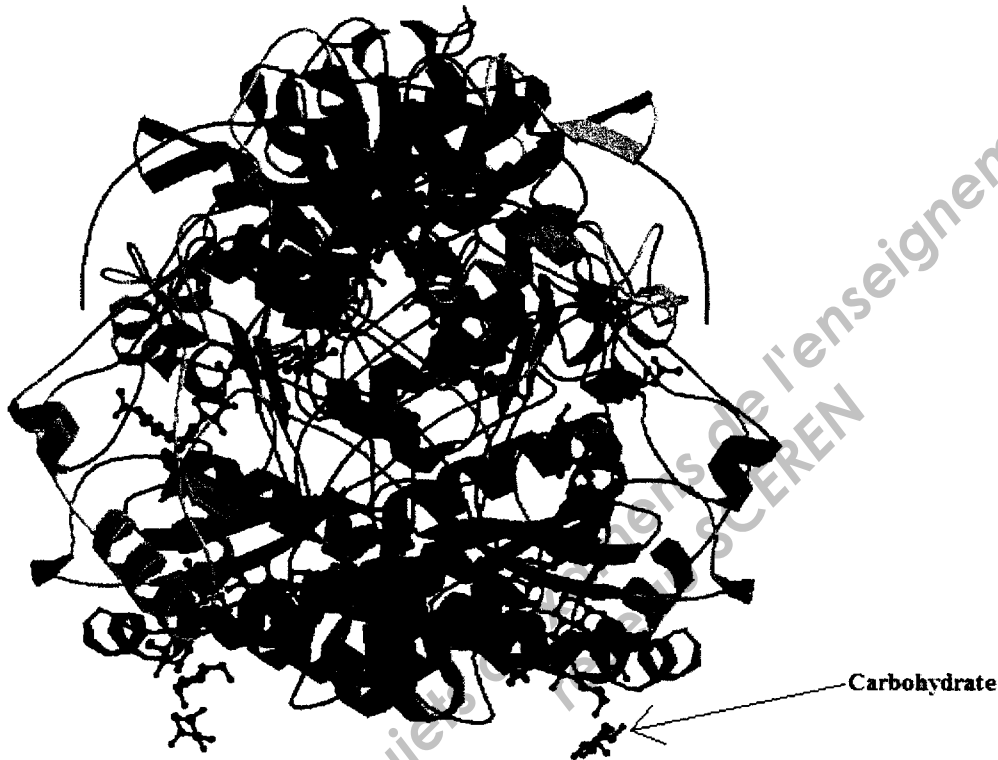
- 4.1 Présenter trois méthodes d'immobilisation d'enzymes fondées sur des principes différents.
- 4.2 Préciser les avantages et inconvénients des enzymes immobilisés par rapport aux enzymes natifs.
- 4.3 Indiquer le type d'immobilisation choisi pour la glucose oxydase dans l'électrode ABL 800 et décrire le mode de fixation des enzymes par le glutaraldéhyde.
- 4.4 A l'aide du **document 4**, préciser les différentes étapes permettant la détection et le dosage du glucose par l'électrode à glucose.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (1 point)

Justesse et rigueur de l'expression écrite (orthographe, grammaire, vocabulaire)
Clarté de la présentation générale de la copie et fluidité de la lecture

Document 1 : Structure de la glucose oxydase

GOx is a dimeric protein with a molecular weight of 160 kDa, containing one tightly bound FAD per monomer as cofactor (actually two FAD-sites per the enzyme). The FAD is not covalently bound and can be released from the protein. This process can be performed under mild conditions preventing full denaturation of the protein. The respective GOx apo-enzyme can be produced by the FAD extraction. The apo-enzyme missing the FAD cofactor is not biocatalytically active, but it can be reconstituted with native or artificially modified FAD cofactor. The enzyme is glycosylated with a carbohydrate content of 16% (w/w). The carbohydrate moiety is designated as high mannose type with 80% (w/w) of the carbohydrate being mannose. The mannose is N and O glycosidically linked to Asn, Thr and Ser.



Document 2 : Purification de la glucose oxydase

The starting material for this preparation was 50 g of *A.niger* extract with a specific activity of 13,9 μ moles per minute per mg of protein.

Step	Procedure	Volume mL	Specific activity μ moles/min/mg protein	Total units μ moles/min
1	After dialysis	374	20	100000
2	Carboxyméthyl cellulose chromatography	2000	80	60000
3	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation and dialysis	88	82	56000
4	DEAE-cellulose chromatography	500	92	34000
5	(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation and dialysis	30	92	32600

DEAE ou Diéthylaminoéthyl : $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$

Document 3 : Dosage enzymatique du glucose

3a. Extrait de la fiche technique

GLUCOSE GOD-PAP

Réactif pour le dosage quantitatif du glucose dans le plasma, le sérum et le liquide céphalorachidien (LCR) humains, ou les urines

PRINCIPE (4) (5)

Méthode de Trinder. Le glucose est oxydé par la GOD en acide gluconique et H_2O_2 qui réagit en présence de POD avec le chloro-4-phénol et le PAP pour former une quinonéimine rouge. L'absorbance du complexe coloré, proportionnelle à la concentration en glucose dans le spécimen est mesurée à 500 nm.

REACTIFS

flacon R1 TAMPON ENZYMES

Tampon phosphate	150	mmol/L
Glucose oxydase (GOD)	$\geq 20\ 000$	UI/L
Péroxydase (POD)	≥ 1000	UI/L
4-Amino-antipyrine (PAP)	0,8	mmol/L

flacon R2 CHROMOGENE

Chloro-4-phénol	2	mmol/L
-----------------	---	--------

flacon R3 ETALON

Glucose	1	g/L (5,55 mmol/L)
---------	---	-------------------

PREPARATION DES REACTIFS

Flacon R1 et R2 : si nécessaire, utiliser un objet non coupant pour enlever la capsule aluminium.

Mesurer le volume d'eau déminéralisée indiqué sur l'étiquette du flacon R1 (Tampon-Enzymes) à l'aide d'un récipient gradué.

Verser le contenu du flacon R1 dans le récipient et mélanger doucement jusqu'à complète dissolution (environ 2 minutes). Ajouter ensuite le contenu du flacon R2 et mélanger doucement. Stocker à l'abri de la lumière dans un flacon plastique exempt de toute contamination.

LIMITE DE LINEARITE

La réaction est linéaire jusqu'à 5 g/L (28 mmol/L).

Au-delà, diluer le spécimen avec une solution NaCl à 9 g/L et refaire le dosage en tenant compte de la dilution dans le calcul du résultat. La limite de linéarité dépend du rapport de volume spécimen/réactif.

MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)

Ramener les réactifs et spécimens à température ambiante.

Mesurer dans des tubes à essais bien identifiés :	Blanc	Etalon	Dosage
Réactif	1 mL	1 mL	1 mL
Eau déminéralisée	10 μ L		
Etalon		10 μ L	
Spécimen			10 μ L

Bien mélanger. Incuber 10 minutes à 37°C ou 20 minutes à température ambiante.
Lire les absorbances à 500 nm (460-560) contre le blanc réactif.
La coloration est stable 15-20 minutes à 37°C, puis décroît lentement.

Remarque : des procédures spécifiques sont disponibles pour les analyseurs automatiques. Contacter le service technique BIOLABO.

Source : fiche Biolabo SA.

3b. Dosage du glucose dans le milieu de fermentation au temps 60 min

	Blanc	Etalon	Dosage	Blanc dosage
Réactif μ L	1000	1000	1000	-
ED μ L	10	-	-	1000
Etalon μ L	-	10	-	-
Milieu de fermentation dilué 1/10 μ L	-	-	10	10
Absorbance à 500 nm	0	0,150	0,340	0,040

Remarque : la mélasse et le milieu de fermentation ont une couleur brun foncé plus ou moins intense.

Document 4 : Electrode à glucose ABL-800

ABL-800

Electrode à glucose

