

### Obtention d'un lait à teneur réduite en lactose de lactase à l'aide de micro-organismes producteurs de bêta-galactosidase

Séquence prévue le deuxième trimestre de l'année de terminale STL

#### Activités technologiques

- Caractérisation d'un microorganisme producteur de beta-galactosidase,
- Production, extraction (purification) de l'enzyme,
- Étude de l'activité enzymatique de l'extrait obtenu

#### Compétences visées :

- Exploiter des ressources documentaires et des activités expérimentales pour présenter les propriétés structurales et catalytiques des enzymes (beta-galactosidase) ;
- Identifier des microorganismes (producteurs de beta galactosidase) ;
- Observer et décrire les caractéristiques morphologiques et microscopiques des moisissures
- Mettre en œuvre une identification de bactérie par une galerie miniaturisée ;
- Mettre en évidence qualitativement une biomolécule (test ONPG)
- Mettre en œuvre un suivi de croissance d'une bactérie (E.coli)
- Utiliser une technique unitaire de fractionnement pour extraire ou purifier des biomolécules (centrifugation) ;
- Effectuer une purification d'enzyme et établir le tableau de suivi ;
- Déterminer la vitesse initiale d'une réaction enzymatique en suivant le produit formé (ONPG → ONP).

#### Contexte mobilisateur :

##### Thème

Santé / bioindustries : production de lait à teneur réduite en lactose (personnes alactasiques)

##### Situation déclenchante pour une mise en activité des élèves :

Analyser deux étiquettes de pack de lait à teneur réduite en lactose pour mettre en évidence le lien entre l'argument commercial et la composition du lait.

Questionnaire et recherche de ressources documentaires pour la mise en action des élèves.

- Qu'est-ce que la lactase ? (enzyme : protéine recherche d'images de molécules sur internet, substrat et produits : images de molécules sur internet, en lien avec CBSV).
- Quel est le rôle de la lactase dans la digestion chez l'homme? Quel est le rôle de la lactase comme additif dans le lait ?
- Comment est produite la lactase, quelles sont les conditions de production de cette enzyme chez les bactéries ? (induction, T°C, pH...)
- Comment mettre en évidence l'activité beta gal d'un microorganisme au laboratoire ?

## Planification et contenus de la séquence

SEANCE	ACTIVITES TECHNOLOGIQUES	ORGANISATION TEMPORELLE	FORMES D'ANIMATION / POSTURE ENSEIGNANT	ORGANISATION SPATIALE ET LOGISTIQUE	RESSOURCES-PEDAGOGIQUES	TRACE ECRITE, RESTITUTION	REINVESTISSEMENT
1 La lactase : rôle, production	Exploitation de ressources documentaires	2H, classe entière <i>Recherche documentaire</i>	Travail en groupe / <b>accompagnement</b>	CDI Accès internet	TICE (recherche doc) – lien CBSV (molécules) Questionnaire Analyse étiquettes	Présentation orale : réponses au questionnaire Mise en commun	• Collecte d'infos qui seront utilisées dans la séance 2
2 Etude de microorganismes producteurs de $\beta$ -galactosidase	Examen macro et micro de souches moisissures, levures, bactéries, repiquage sur milieu lactosé, Mise en œuvre du test ONPG	2H + 2H : <i>Manipulations</i>	Autonomie détermination du Mode opératoire pour le test ONPG (principe, réalisation...) <b>Accompagnement</b>	Laboratoire Microscope Souches sur milieu solide lactosé réactif ONPG Bain thermostaté	questionnaire complété en séance 1 Fiches Compétences de première ( $\mu$ org) <b>Supports théoriques</b> Induction	Mode opératoire rédigé pour le test ONPG  Résultats obtenus pour les différentes souches testées	• Vérification ciblée d'un caractère
3 Vérification d'identité d'un microorganisme producteur de $\beta$ -galactosidase	Mise en évidence de caractères morphologiques, micro et macro, culturaux et métaboliques d' <i>E.coli</i> et <i>Aspergillus</i>	1H travail préliminaire : galerie bactérie et moisissure 3H + 2H : identification <i>Manipulations</i>	Travail binôme (mode op API)  Mise en œuvre individuelle ou en binôme Accompagnement	Laboratoire Microscope Bleu coton Sabouraud API 20 E	Notice technique API 20 E <b>Support</b> : schémas et/ou photo : « identification des moisissures » Méthode d'identification vue en classe de première :	Construction du mode op à partir de la notice technique CR identification moisissure & bactérie	• Choix dirigé d'une souche pour la séance 4
4 Production de $\beta$ -galactosidase par <i>E.coli</i>	Suivi de croissance <i>E.coli</i> productrice de $\beta$ -galactosidase	4H : préparation inoculum, mesure absorbance toutes les 15 min <i>Acquisition de concepts Manipulations</i>	Présentation par le professeur puis accompagnement	Bouillon LB lactosé bain à agitation thermostaté Spectro + cuves	<b>Support théorique</b> principe croissance : phases, paramètres, effecteurs	Courbe de croissance tracée au cours du suivi	• Conservation culture d' <i>E.coli</i> avec $\beta$ -gal (métabolite primaire) pour séance 5
5 Récupération de l'enzyme produite par <i>E.coli</i>	Extraction et purification de l'enzyme produite par <i>E.coli</i>	1H, Travail préliminaire : rôle des étapes ? <i>activité documentaire</i> 3h, Mise en œuvre de l'extraction <i>Manipulation</i>	Travail binôme recherche documentaire  Groupe d'atelier	Salle accès internet Labo : bouillon <i>E.coli</i> 48H, centrifugeuse, tampon P, $(NH_4)_2 SO_4$ , alternative à la sonication	Questionnaire TICE : Annexe 1 purif. CAPET 2005  Mode opératoire adapté au labo	Doc réponse questionnaire à rendre au prof (CAPET 2005)  Mise en commun	• Les réponses au questionnaire : deviennent support de cours « purification d'enzyme » • Récupération de l'extrait
6 Etude de l'activité enzymatique de l'extrait obtenu comparé à une solution commerciale de lactase	Détermination de l'activité enzymatique de l'extrait obtenu et de la solution du commerce <i>Manipulation</i>	2 séances de 3H Détermination $V_i$ Etude cinétique ( $K_M$ et $V_{max}$ )	Groupe d'atelier Présentation de la manip puis accompagnement	ONPG, spectro, tampon P solution d'enzyme séance 5 et commerciale	<b>Support théorique</b> « enzymologie » Mode opératoire de l'activité technologique	$V_i$ , $K_M$ et $V_{max}$ des deux préparations <b>Compte-rendu</b> comparaison des deux activités	• Commenter et critiquer les résultats obtenus avec les 2 préparations

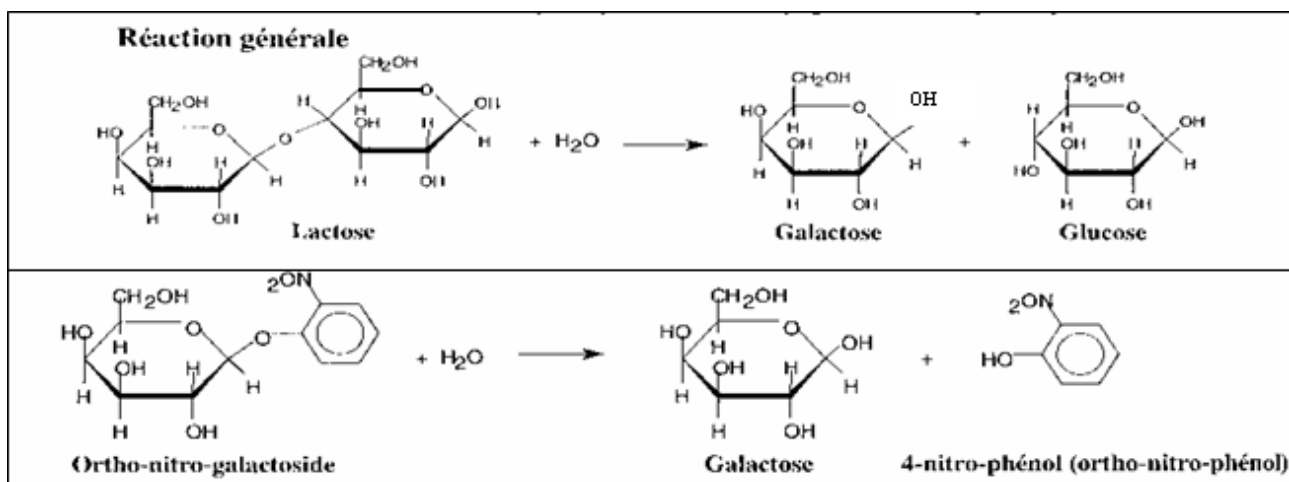
## Evaluation formative

- Séance 2 – réinvestissement des compétences acquises en première (utilisation du microscope, colorations usuelles, isolement)
- Séance 3 – vérification d'identité des deux microorganismes producteurs de bêta-galactosidase : repérage des acquis de la démarche et des difficultés en vue d'une remédiation.
- Séance 4 – évaluation des compétences liées à la manipulation aseptique lors des prélèvements réguliers au cours de la croissance
- Séance 5 – Validation des réponses au questionnaire après mise en commun
- Séance 6 – compte-rendu : analyse comparée des résultats et contribution des binômes à l'élaboration de l'organigramme final concernant la thématique « bêta-galactosidase »

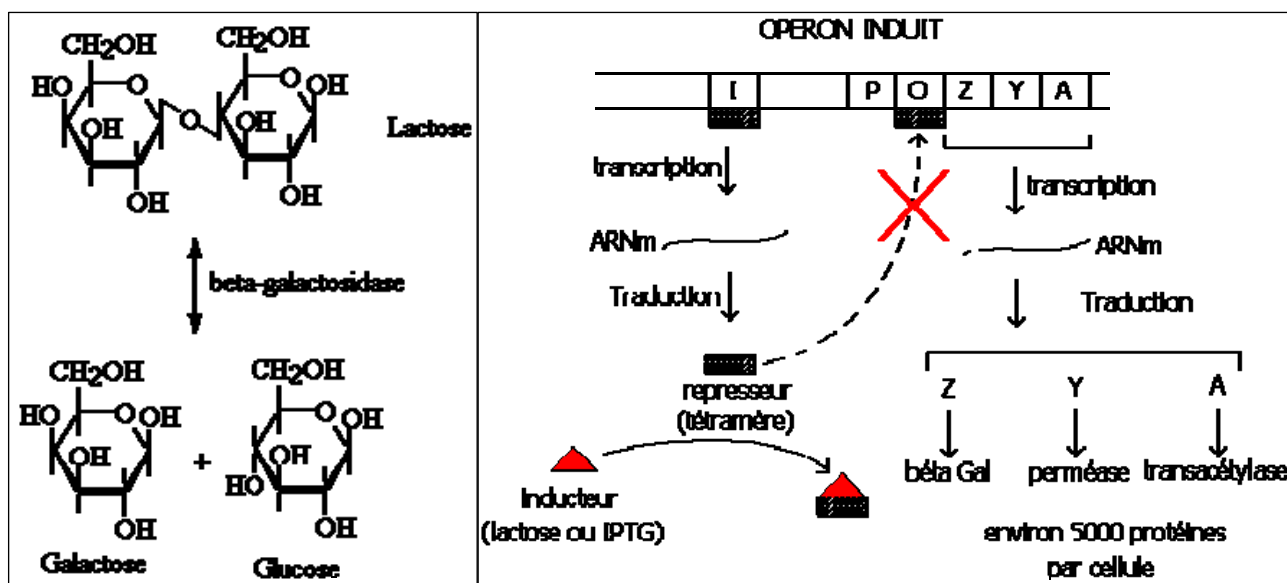
## Mise en valeur des productions :

Organigramme des manipulations et des résultats associés depuis le début avec mise en commun (présentation par groupes) et échange pour constitution d'un document final qui pourra être publié sur le site du lycée.

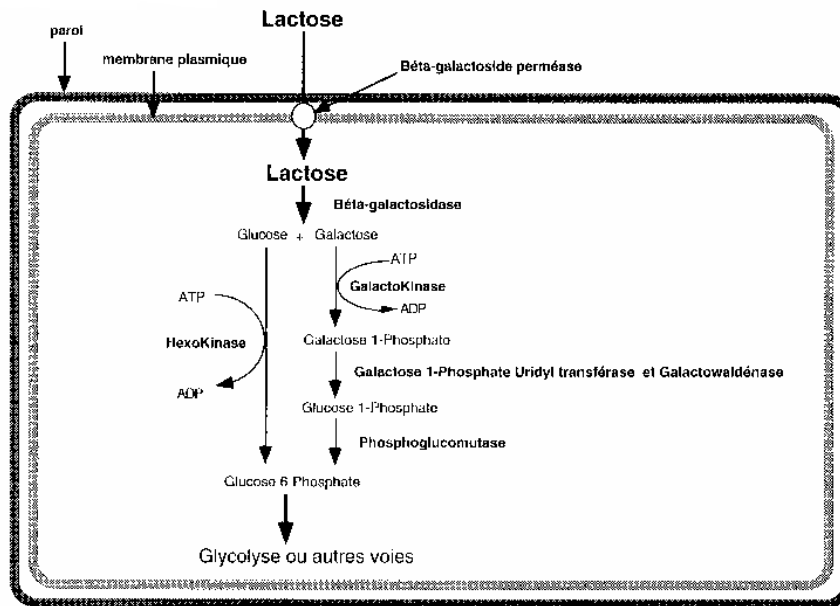
## Documents ressources possibles pour la recherche documentaire (séance 1)



Source : [www2.ac-lyon.fr](http://www2.ac-lyon.fr), 02/05/12



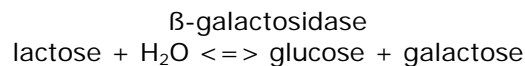
Source : [course1.winona.edu](http://course1.winona.edu), 02/05/12



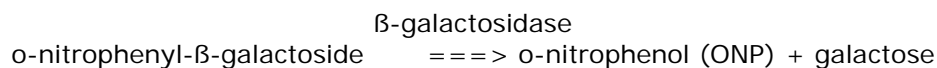
Source : cours-de-biochimie.fr, 02/05/12

## The $\beta$ -Galactosidase Assay

L'activité de la  $\beta$ -galactosidase consiste à accélérer la vitesse d'hydrolyse de la liaison osidique d'un disaccharide appelé  $\beta$ -galactoside. Les oses libérés sont métabolisés et participent à la production d'énergie via la glycolyse et le cycle de Krebs.



Les produits naturels de la réaction n'étant pas colorés, ils sont difficilement détectables, c'est pourquoi la détermination de l'activité s'effectue en présence d'un substrat artificiel (ONPG) dont l'un des produits d'hydrolyse (ONP) est coloré et peut être quantifié par spectrophotométrie à 420 nm.



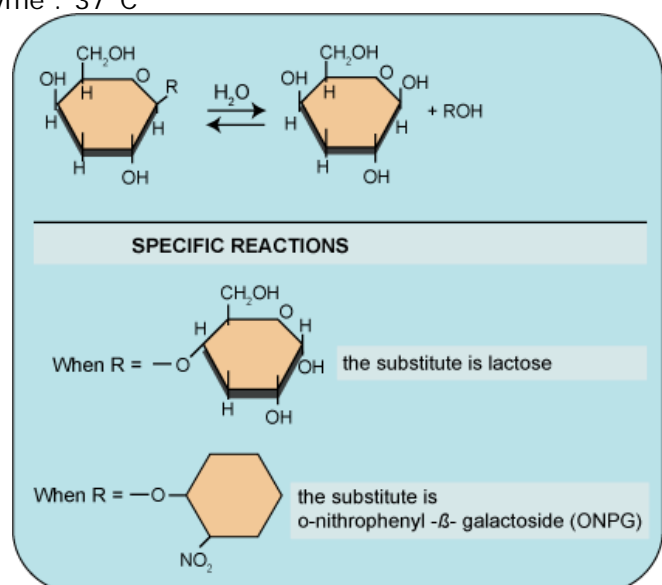
Conditions opératoire:

Température optimale d'activité de l'enzyme : 37°C

Substrat non limitant

Méthode cinétique

Arrêt de la réaction par alcalinisation du milieu.



Reactions catalyzed by  $\beta$ -galactosidase

## Overview of assay

Using disposable glass tubes for these assays, you will add 10-50  $\mu\text{l}$  of sample to 1 ml of Z buffer, a buffer in which  $\beta$ -galactosidase has full activity. The Z buffer containing the sample and the ONPG substrate will then be separately pre-incubated to 37°C. The enzymatic reaction will begin as soon as you add the substrate to the samples. After you incubate the tubes for a sufficient length of time, you will terminate the reaction in all the tubes, using the STOP solution ( $\text{NaCO}_3$ ). Read the sample absorbance on the spectrophotometer after transferring the contents of the tube to a plastic cuvette.

1. **Make a Flow Chart.** Begin your preparations by making a flow chart or outline that details exactly what you are going to do in this assay. Save this flow chart as you did for the Bradford Assay and modify it as you refine and streamline your technique.
2. **Turn On The Spec.** Turn on the spectrophotometer and set the wavelength to 420 nm.
3. **Dilute The Sample(s).** In your first assay you will be using a sample of  $\beta$ -galactosidase provided by your instructor. It will be your job to determine the activity of this sample. (After starting the purification, you will be using your own samples.) Prepare a few dilutions of this sample. What will be the diluent?
4. **Add The Samples and Control To Z Buffer.** Add 10-50  $\mu\text{l}$  of the diluted sample(s) to 1 ml of Z buffer. As always, remember to write down how much sample you used.
5. Prepare a control tube by adding a volume of buffer that is equal to the volume of sample used in step 4 (10-50  $\mu\text{l}$ ) to a tube containing 1 ml of Z buffer. This functions as a control for the spontaneous hydrolysis of your substrate, ONPG, and will serve as your calibration blank for the spectrophotometer.
6. **Equilibrate.** Equilibrate the samples to be assayed to 37°C. Make sure the ONPG (4 mg/ml in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.5) is also at 37°C. Prepare fresh ONPG solution each day.
7. **Begin The Reaction.** Add 0.2 ml of ONPG to each tube and record the time.
8. **Incubate.** Incubate the samples at 37°C until yellow color appears. The color change should take at least 10 minutes but may take longer to result in an absorbance of 0.3 to 0.9. A very rapid color change (1-5 minutes) indicates that there is too much activity to measure accurately. Such samples should be repeated at a higher dilution. Samples containing low concentrations of  $\beta$ -galactosidase may take significantly longer than 10 minutes to become yellow. (Why is a rapid color change (0.5 O.D. in 2 minutes) not accurate?)
9. **Stop The Reaction.** Add 0.5 ml of 1 M  $\text{NaCO}_3$  (Stop Solution) to terminate the reaction and record the time.
10. **Read The Samples.** Transfer the samples to plastic cuvettes and read the  $A_{420}$  against the blank.
11. **Determine The Enzyme Activity:** Calculate the enzyme activity present in your sample using the formula shown below:

$$\text{Units of } \beta\text{-galactosidase} = \frac{A_{420} \times 0.380}{\text{minutes at } 37^\circ \text{ C}}$$

12. One unit is the amount of enzyme that will hydrolyze  $10^{-6}$  moles/minute of ONPG at 37°C and 0.380 in the above equation is the constant used to convert the  $A_{420}$  reading into these units. This constant is a function of the molar extinction coefficient for ONP+ that, under these conditions, is  $4500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . What is a molar extinction coefficient?