

## TP1 – ACTIVITE ENZYMATIQUE

L'amylase est une enzyme digestive, elle est produite dans la salive et dans le pancréas. Les enzymes sont des protéines, elles sont formées d'une ou plusieurs molécules séquencées d'acides aminés. On cherche à connaître le rôle de l'amylase sur la dégradation de l'amidon.

**Proposez une stratégie qui permette de comprendre le rôle de l'amylase sur l'hydrolyse de l'amidon :**

**Réponse attendues :** un tube avec de l'amidon et de l'amylase et un tube avec de l'amidon et de l'eau.

**Que va-t-on vérifier ?** si avec l'amylase l'amidon disparaît alors qu'elle ne disparaît pas sans amylase. On peut comparer les vitesses de disparition de l'amidon si elle disparaît dans les deux cas.

Donc on voit le protocole proposé ; lisez-le et comprenez ce que vous avez à faire.

### Matériel disponible et protocole d'utilisation du matériel

#### Matériel biologique :

- Empois d'amidon [1 g/l]
- Solution d'amylase
- Solution HCl molaire
- Pissette d'eau
- Eau iodée
- Plaquettes
- Compte-gouttes

- Vous disposez d'un bécher contenant 50 ml d'empois d'amidon, préparez 6 tubes à essais
- Tube 1 : 10ml d'empois d'amidon + 3 ml d'HCl immédiatement placé dans le bain marie à 100°C
- Tube 2 : 10 ml d'empois d'amidon + 3 ml d'HCl à 35°C
- Tube 3 : 10 ml d'empois d'amidon + 3 ml d'amylase à 35°C
- Tube 4 : 10 ml d'empois d'amidon + 3 ml d'eau à 35°C

Pour chacun des tubes, vous faites un prélèvement toutes les 3 minutes, et réalisez immédiatement un test à l'eau iodée

Prélèvements à **t=0, t=3mn, t=6mn, t=9mn, t=12mn, t=15mn, t=18mn et t=21mn**

1°) Présentez vos résultats sous une forme scientifique puis montrez l'action des enzymes présente un intérêt biologique. Justifiez alors le terme de biocatalyseur utilisé pour qualifier une enzyme.

Réalisez un tableau à double entrée :

	T=0	T= 3 mn	T=6mn	T=9 mn	T=12 mn	T=15 mn	T=18 mn	T=21mn
TUBE 1(Hcl+amidon100°C)	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	+++	+	-
TUBE 2(HCl+ amidon à 35°C)	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
TUBE 3 (Amidon+amylase)	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	++++	+++	++
TUBE 4 (amidon +eau)	+++++	+++++	+++++		+++++	+++++	+++++	+++++

Conclusion : L'amidon ne s'hydrolyse pas avec uniquement en présence d'eau, L'hydrolyse de l'amidon en dehors de l'organisme nécessite un milieu acide **et** une température élevée. Ce sont des conditions non réalisables dans l'organisme. Avec l'acide à température ambiante, pas de disparition de l'amidon. On constate que la présence de l'amylase permet la disparition de l'amidon donc l'amylase remplace à la fois l'acide et la température élevée.

C'est un **biocatalyseur** : en chimie vous avez vu que le catalyseur accélère la réaction ok et qu'ils ne font pas partie du bilan réactionnel. On les retrouve en fin de réactions intactes.

**Comment pourrait-on le vérifier que les enzymes sont intactes en fin de réaction ?**

On pourrait reprendre un tube avec 10ml d'empois d'amidon. On récupère sur la plaquette la solution dans laquelle il y a l'amylase après disparition de l'amidon (plaquette du tube 3). Allez on essaie !!!!

## ACTIVITE 2 : quelle propriété de l'amylase (et des enzymes en général) leur permet d'agir sur le réactif ?

Vous allez utiliser un logiciel de visualisation des molécules RASTOP. Ouvrez RASTOP.

<ouvrir> - sur le bureau dossier TP enzymes-TSspe. Choisissez dans un premier temps 2 molécules : amylase salivaire humaine 1MFV et Amylase\_amidon.3L2L

<Fenêtre> - <mosaïque> : vous obtenez à l'écran les deux molécules en représentation fil de fer. Pour chacune d'elle <atome> - <colorer par> - <chaîne>

Amylase salivaire humaine : amylase bleue et 2 molécules de polymères du glucose (=analogues structuraux de l'amidon)

Amylase\_amidon : bleu foncé amylase (chaîne A) en bleu ciel polymère de 6 glucoses (chaîne B) et en vert polymère de 3 Glucose (chaîne C). Les chaînes B et C sont les analogues structuraux de l'amidon

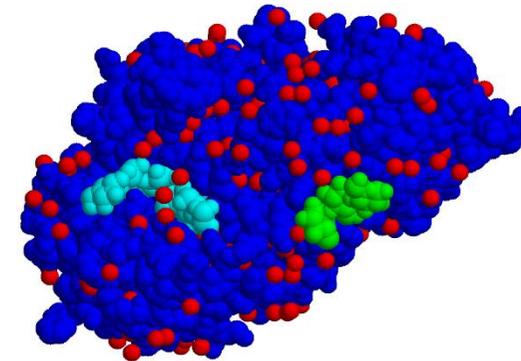
Pour chaque molécule <propriété> - <proteique> - icône <en boule>

1°) Décrivez ce que vous observez

On observe les molécules avec des reliefs et des creux au sein desquels sont insérés les molécules de dextrans. L'enzyme est comme un oreiller au sein duquel sont aménagés des creux pour que s'insèrent les polymères du glucose : **On définit le site actif de l'enzyme**

**SCHEMA au tableau.** Il faut donc que le réactif entre en liaison, en contact avec l'enzyme. Cela implique donc une complémentarité moléculaire entre le site actif de l'enzyme et la molécule de réactif.

Quelle est la conséquence immédiate de cette complémentarité moléculaire entre le site actif de l'enzyme et le réactif ? 1 seul type de molécule l'amidon peut s'insérer dans le site actif de l'amylase → l'enzyme est spécifique d'un réactif et un autre réactif doit avoir une partie de sa molécule complémentaire du site actif de l'enzyme : **spécificité de réactif**



Conservez la molécule 1MFV – revenir à la présentation fil de fer

Vous allez repérer certains acides aminés de l'amylase : Trp 59, Tyr 62, Asp 197, His 299, Glu 233 et Asp 300.

<Éléments>, descendez l'ascenseur jusqu'à la liste des acides aminés : vous choisissez 1 (par ex Trp) puis cliquez sur l'icône

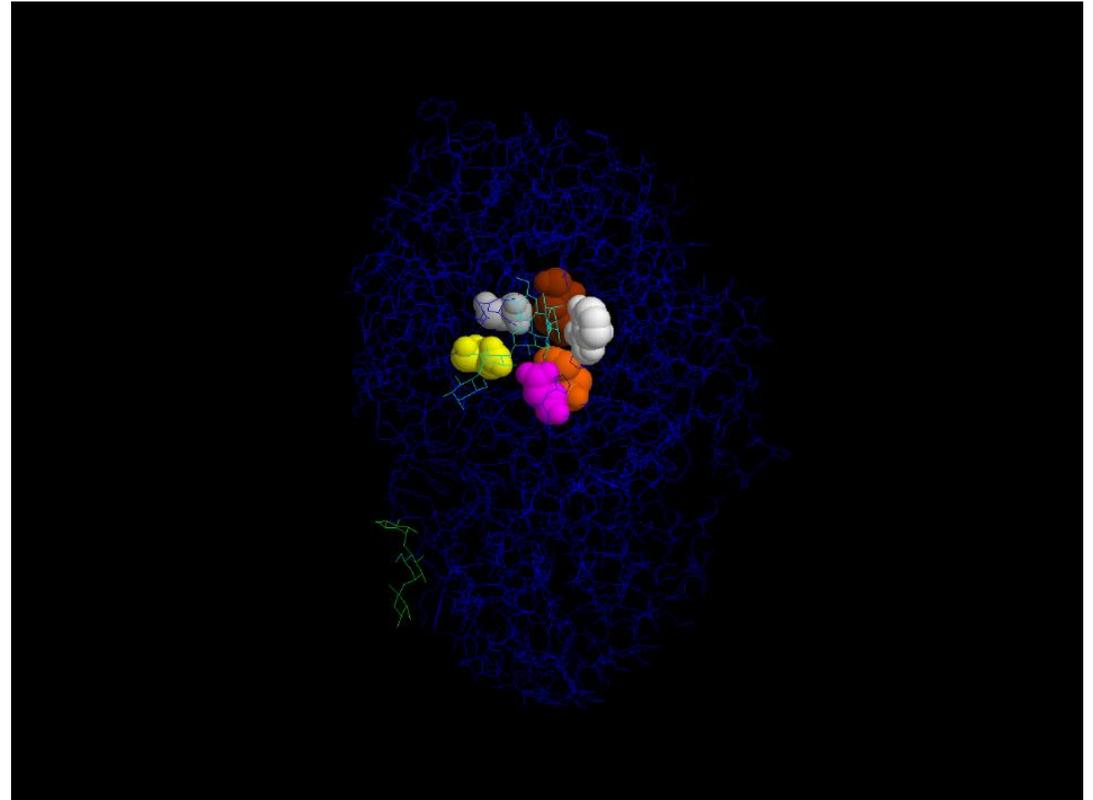
AbC

Vous tapez le numéro correspondant puis vous validez :  en haut à gauche. Vous choisissez une couleur différente avec la palette des couleurs et <en boule>. Vous reproduisez la même chose pour tous les aa de la liste

2°) que constatez-vous ?

On a délimité des acides aminés qui sont au contact de l'analogue structural de l'amidon. Ce sont donc les acides aminés du site actif de l'enzyme : 3 assurent la liaison avec le réactif et 3 sont responsables la réaction chimique. Que se passe-t-il si on change 1 de ces acides aminés ? soit la liaison entre l'enzyme et le réactif de se fera pas (aa de liaison modifiés) soit la réaction chimique ne se produira pas (aa catalytiques modifiés).  
**Spécificité d'action**

3°) Si vous avez le temps, ouvrez l'amylase\_acarbose 1ppi et expliquez pourquoi en présence d'acarbose l'activité de l'amylase diminue fortement. Elle ressemble aux molécules de polymère du glucose donc elle se fixe à la place du réactif (l'amidon) et ainsi l'enzyme ne peut transformer l'amidon en dextrines.  
**BILAN** : Un enzyme catalyse une réaction biochimique de transformation de réactifs en produits.



	T=0	T= 3 mn	T=6mn	T=9 mn	T=12 mn	T=15 mn	T=18 mn	T=21mn
TUBE 1(Hcl+amidon100°C)								
TUBE 2(HCl+ amidon à 35°C)								
TUBE 3 (Amidon+amylase)								
TUBE 4 (amidon +eau)								
Conclusion :								