Ce document a été mis en ligne par l'organisme FormaV®.

Toute reproduction, représentation ou diffusion, même partielle, sans autorisation préalable, est strictement interdite.

Pour en savoir plus sur nos formations disponibles, veuillez visiter :
formav.co/explorer

BTS BIORP • CORRIGÉ DÉTAILLÉ

BTS BioRP

Biochimie structurale et fonctionnelle des protéines

Session 2017 • Code sujet : **BOE3BP** • Durée : **2 h 00** • Coefficient : **1**

Sommaire

Cliquez sur une partie pour y accéder directement

1. Structure et mode d’action des kératinases (2 questions) **Page 3**

2. Purification de la kératinase d’Aspergillus oryzae (8 questions) **Page 4**

3. Caractérisation de l’activité enzymatique de la kératinase d’Aspergillus oryzae (5 questions) **Page 8**

4. Ce qu’il faut retenir & Questions fréquentes (FAQ) (Synthèse & Q&A Examen) **Page 11**

Sujet officiel (PDF) : https://btsbiorp.fr/assets/annales/bts-biorp/E3 - Gestion opérationnelle du laboratoire/2017/BTS BioRP - E3 - Gestion opérationnelle du laboratoire - Session 2017 - 1-Sujet.pdf

1. Structure et mode d’action des kératinases

La kératine est une protéine fibreuse abondante dans les phanères, difficile à dégrader par les protéases classiques, et les kératinases microbiennes pourraient contribuer à valoriser ces déchets. Le sujet présente les kératinases comme des protéases à sérine et s’appuie sur la structure cristalline d’une kératinase bactérienne.

Question 1.1. Indiquer la classe d’enzymes à laquelle appartiennent les kératinases. Reporter les noms des structures secondaires repérées par les numéros 1 et 2 du document 1, préciser la nature des interactions qui les stabilisent et indiquer la technique ayant permis de déterminer la structure de cette kératinase.

Les kératinases sont des hydrolases, plus précisément des protéases à sérine. Sur le document 1, le numéro 1 désigne une hélice α et le numéro 2 un feuillet β. Ces structures secondaires sont stabilisées par des liaisons hydrogène entre les groupements du squelette peptidique : au sein de l’hélice, et entre les brins du feuillet. La structure cristalline a été déterminée par cristallographie aux rayons X, comme le confirme la résolution de 1,7 Å indiquée dans le document.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Kératinases : hydrolases protéolytiques à sérine. 1 : hélice α ; 2 : feuillet β. Stabilisation par liaisons hydrogène. Structure déterminée par cristallographie aux rayons X.

Question 1.2. La structure présentée montre quatre domaines protéiques. Proposer une définition de la notion de domaine protéique.

Un domaine protéique est une région d’une chaîne polypeptidique qui forme une unité compacte et possède une organisation tridimensionnelle propre. Il peut souvent se replier de manière relativement autonome et contribuer à une fonction particulière. Une protéine peut donc réunir plusieurs domaines distincts, comme la kératinase bactérienne du document 1, qui en comporte quatre.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Un domaine est une région compacte d’une protéine, organisée en une unité tridimensionnelle relativement autonome.

2. Purification de la kératinase d’Aspergillus oryzae

Une souche d’Aspergillus oryzae produit une kératinase extracellulaire de 60 kDa après culture en milieu liquide. La purification fait appel à la précipitation au sulfate d’ammonium, à la dialyse, à des chromatographies et à l’ultrafiltration, puis elle est évaluée par des données quantitatives et une SDS-PAGE.

Question 2.1. Proposer une méthode permettant d’obtenir un extrait brut de kératinase à partir de la culture d’Aspergillus oryzae.

La kératinase étant extracellulaire, elle est libérée dans le milieu de culture. Après les cinq jours de culture, séparer le mycélium et les cellules du liquide par centrifugation ou filtration. Récupérer le surnageant, ou le filtrat, qui contient l’enzyme et constitue l’extrait brut. Effectuer si possible cette clarification au froid pour limiter la perte d’activité enzymatique.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> L’extrait brut est le surnageant clarifié de la culture.

Question 2.2. À partir des résultats de précipitation différentielle au sulfate d’ammonium du document 2, indiquer la fraction à retenir pour la suite de la purification et justifier la réponse.

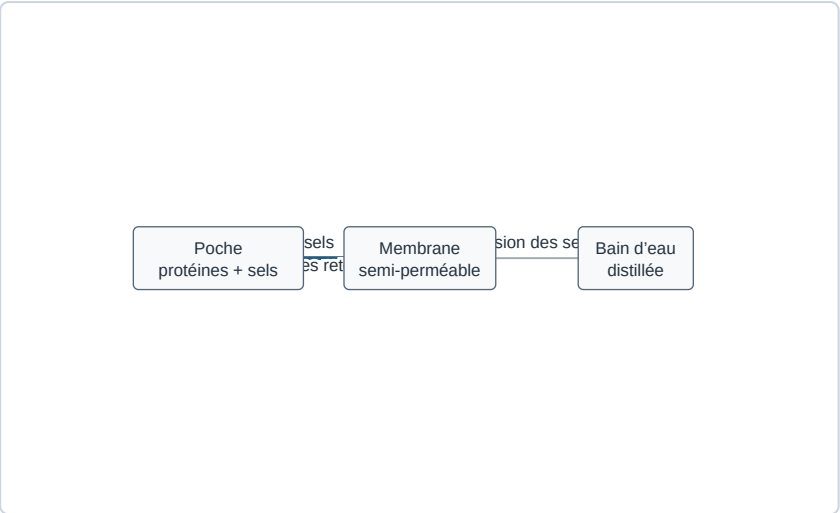
La fraction précipitée à 85 % de saturation présente l’activité kératinase spécifique la plus élevée du tableau, soit 88,07 U/mg de protéines. Elle possède aussi la plus forte activité relative récupérée, 39,27 %. Elle concentre donc la part la plus importante de l’activité recherchée parmi les fractions de précipitation étudiées et doit être retenue pour la suite de la purification.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Retenir le précipité obtenu à 85 % de saturation en sulfate d’ammonium.

Question 2.3. Présenter, sous la forme d’un schéma annoté, le principe de la dialyse utilisée pour dessaler les fractions.

Placer la fraction à dessaler dans une poche munie d’une membrane semi-perméable, puis immerger celle-ci dans de l’eau distillée froide. Les sels et autres petites molécules diffusent de la poche vers le bain à travers la membrane. Les protéines, trop volumineuses pour la traverser, restent dans la poche. Le renouvellement du bain maintient le gradient de concentration et favorise le dessalage.

Dialyse d’une fraction protéique



La membrane laisse passer les sels, mais retient les protéines dans la poche.

✓ RÉPONSE À RETENIR

Les sels diffusent vers le bain; les protéines restent dans la poche de dialyse.

Question 2.4. À partir du chromatogramme de gel-filtration sur Sephadex G-75 du document 3, proposer les numéros des fractions à collecter pour la suite de la purification et argumenter le choix.

Collecter les fractions 8 à 13 : elles couvrent le pic principal d’activité kératinase, avec un maximum autour de la fraction 10. Ce pic coïncide avec le pic principal de protéines, ce qui indique que l’enzyme est présente dans ces fractions. Les autres pics protéiques du chromatogramme ne présentent pas d’activité kératinase comparable.

✓ RÉPONSE À RETENIR

Collecter les fractions 8 à 13, correspondant au pic principal d’activité.

Question 2.5. Expliquer la méthode d’élution des protéines utilisée en chromatographie échangeuse d’ions. Proposer une autre méthode d’élution possible.

Après l’élution au tampon phosphate à pH 8, le protocole augmente la force ionique en ajoutant 0,05 M de NaCl au tampon. Les ions du sel concurrencent les protéines fixées sur l’échangeur DEAE et favorisent leur désorption. Une autre méthode consiste à modifier le pH du tampon pour changer la charge des protéines et réduire leur interaction avec la résine.

✓ RÉPONSE À RETENIR

Élution par augmentation de la force ionique; autre méthode : modifier le pH.

Question 2.6. **Parmi les unités de filtration proposées, avec des seuils de coupure de 3, 10, 30, 50 et 100 kDa, choisir celle qui permettra de concentrer l'enzyme d'intérêt et argumenter le choix.**

La kératinase a une masse moléculaire de 60 kDa. Pour la concentrer, il faut une membrane dont le seuil de coupure est inférieur à cette masse, afin que l'enzyme soit retenue tandis que l'eau et les petites molécules traversent. Le seuil de 50 kDa répond à ce critère. Un seuil de 100 kDa serait trop élevé et risquerait de laisser passer l'enzyme.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Choisir l'unité d'ultrafiltration de seuil de coupure 50 kDa.

Question 2.7. **À partir des données du document 5, calculer le rendement global et le taux de purification, ou enrichissement, global. Présenter les équations aux grandeurs et aux valeurs numériques, puis commenter les résultats du rendement et du taux de purification.**

Le rendement compare l'activité totale de FC à celle de l'extrait brut. L'enrichissement compare les activités spécifiques, obtenues en divisant l'activité par la masse de protéines. Le rendement inférieur à 100 % traduit une perte d'activité au cours de la purification. L'augmentation de l'activité spécifique indique une élimination importante de protéines non recherchées.

Indicateur	Formule et application	Résultat
Rendement global	Activité FC / activité brute × 100 = 2760 U / 8275 U × 100	33,35 %
Activité spécifique brute	8275 U / 314 mg	26,35 $U \cdot mg^{-1}$
Activité spécifique FC	2760 U / 9,09 mg	303,63 $U \cdot mg^{-1}$
Enrichissement global	(2760 U / 9,09 mg) / (8275 U / 314 mg)	11,52 fois

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> Rendement global : 33,35 %; enrichissement global : 11,52 fois.

Question 2.8. **À partir de l'électrophorégramme SDS-PAGE du document 6, conclure sur la qualité de la purification et sur la structure de la kératinase d'Aspergillus oryzae.**

La piste de la fraction FC présente une bande unique, ce qui indique une préparation majoritairement homogène et une purification satisfaisante. Sa migration, comparée aux marqueurs, correspond à une masse apparente proche de 60 kDa. Comme l'électrophorèse est réalisée en conditions dénaturantes et réductrices avec le 2-mercaptoéthanol, cette bande correspond à une chaîne polypeptidique. Le gel ne permet pas de déterminer l'organisation native de l'enzyme.

✓ **RÉPONSE À RETENIR**

Purification satisfaisante; une chaîne polypeptidique d’environ 60 kDa en SDS-PAGE réductrice.

3. Caractérisation de l'activité enzymatique de la kératinase d'Aspergillus oryzae

La fraction FC sert à étudier l'effet de molécules sur l'activité kératinolytique et à comparer l'immobilisation de la kératinase sur différents supports. Des documents permettent aussi de comparer les températures optimales et la stabilité thermique des formes libre et immobilisée.

Question 3.1. À partir du document 7, qualifier la nature de l'effet de chaque molécule testée sur l'activité kératinolytique. Sachant que la kératinase nécessite une concentration minimale en ions calcium, proposer le mode d'action de l'EDTA sur l'activité de l'enzyme.

Le témoin sans molécule fixe l'activité de référence à 100 %. Les valeurs supérieures indiquent une activation et celles inférieures, une inhibition.

Molécule	Activité relative	Effet
$CaCl_2$	170,1 %	Forte activation
KCl	117,3 %	Activation
$HgCl_2$	71,2 %	Inhibition
EDTA	24,7 %	Forte inhibition

L'EDTA chélate les ions Ca^{2+} : il en réduit la concentration disponible sous le seuil nécessaire au fonctionnement de la kératinase, ce qui explique la forte baisse d'activité.

> ✓ **RÉPONSE À RETENIR**
>
> $CaCl_2$ et KCl activent la kératinase ; $HgCl_2$ et EDTA l'inhibent. L'EDTA séquestre les ions Ca^{2+} indispensables.

Question 3.2. À partir des résultats du document 8, identifier le support d'immobilisation le plus approprié et argumenter la réponse.

Support	Rendement (%)	Activité spécifique ($U \cdot mg^{-1}$)
Gel de silice	64,2	126,97
Billes de verre fritté	63,6	163,33
Chitine	59,2	111,76
DEAE-cellulose	56,3	104,29
Billes d'alginate	43,0	64,00

Les billes de verre fritté sont à retenir : elles présentent l'activité spécifique la plus élevée, donc l'activité conservée par unité de masse d'enzyme est maximale.

Leur rendement de 63,6 % est également proche du meilleur rendement, 64,2 % pour le gel de silice. Elles offrent ainsi le meilleur compromis entre activité spécifique et quantité d'enzyme immobilisée.

✓ RÉPONSE À RETENIR

Choisir les billes de verre fritté : activité spécifique maximale (163,33 U·mg^{-1}) et rendement élevé (63,6 %).

Question 3.3. Rappeler la signification du paramètre cinétique KM. Proposer une hypothèse expliquant l'augmentation de la valeur apparente de KM pour l'enzyme immobilisée par rapport à la forme libre.

Le K_M est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale atteint la moitié de la vitesse maximale. Dans le modèle de Michaelis-Menten, il renseigne sur l'affinité apparente de l'enzyme pour son substrat : un K_M plus élevé correspond généralement à une affinité plus faible. Après immobilisation, le support peut gêner la diffusion du substrat vers le site actif ou modifier son microenvironnement. Il faut alors davantage de substrat pour atteindre la demi-vitesse maximale, ce qui peut expliquer l'augmentation du K_M apparent.

✓ RÉPONSE À RETENIR

K_M est la concentration en substrat à la demi-vitesse maximale ; sa hausse apparente peut s'expliquer par une diffusion limitée vers l'enzyme immobilisée.

Question 3.4. À partir du document 9a, déterminer la température optimale des formes libre et immobilisée de la kératinase.

La température optimale se lit au maximum de chaque courbe du document 9a. Pour la forme libre, le maximum est atteint à 50 °C, avec une activité relative d'environ 100 %. La courbe de la forme immobilisée atteint son maximum à 60 °C, autour de 115 %, puis l'activité diminue aux températures supérieures. L'immobilisation décale donc la température optimale vers une valeur plus élevée.

✓ RÉPONSE À RETENIR

Température optimale : 50 °C pour la kératinase libre et 60 °C pour la forme immobilisée.

Question 3.5. À partir du document 9b, argumenter l'affirmation selon laquelle l'immobilisation de la kératinase augmente sa stabilité thermique.

Le document 9b compare l'activité résiduelle après préchauffage à durée et température identiques. À 60 minutes, la forme immobilisée conserve davantage d'activité que la forme libre à chacune des températures étudiées :

- À 50 °C : environ 100 % contre 87 %.
- À 60 °C : environ 91 % contre 52 %.
- À 70 °C : environ 59 % contre 42 %.
- À 80 °C : environ 37 % contre 28 %.

La forme immobilisée perd donc moins d'activité sous l'effet de la chaleur, ce qui confirme sa meilleure stabilité thermique.

✓ RÉPONSE À RETENIR

À durée et température égales, l’enzyme immobilisée conserve une activité résiduelle supérieure : sa stabilité thermique est accrue.

Ce qu'il faut retenir de ce sujet (Session 2017)

Bilan de l'épreuve : Épreuve de BTS Biotechnologies, session 2017, code BOE3BP : durée 2 h 00, coefficient 1. Le sujet traite des kératinases comme outils de valorisation des déchets kératiniques, avec l'étude structurale d'une kératinase puis la purification et la caractérisation de celle d'Aspergillus oryzae. Les compétences évaluées incluent l'analyse de documents, les calculs de purification et l'interprétation de l'activité, de l'immobilisation, de la stabilité thermique et la rédaction scientifique.

Notions-clés, formules & règles à maîtriser

- La kératinase est une protéase à sérine ; le document 1 présente une structure cristalline organisée en quatre domaines.
- En gel-filtration, les protéines sont séparées selon leur taille hydrodynamique ; l'activité et la quantité de protéines guident le choix des fractions.
- Rendement global = activité totale finale / activité totale initiale × 100 ; enrichissement global = activité spécifique finale / activité spécifique initiale.
- KM est la concentration en substrat pour laquelle la vitesse initiale atteint la moitié de Vmax dans le modèle de Michaelis-Menten.

Points de vigilance & attentes du jury

- Pour sélectionner les fractions, comparer le profil d'activité kératinolytique au profil de contenu protéique et justifier les fractions retenues.
- Pour les calculs, présenter les équations aux grandeurs, les valeurs numériques, les unités et le commentaire des résultats.
- Pour interpréter la SDS-PAGE, comparer la bande de l'échantillon au marqueur et tenir compte du SDS et du 2-mercaptoéthanol.
- Pour comparer activité optimale et stabilité thermique, distinguer la température de mesure de l'activité du préchauffage et lire précisément les axes.

Questions fréquentes sur cette épreuve (Q&A Examen)

Q : Comment calculer le rendement global de purification avec les données du sujet ?

Divisez l'activité catalytique totale de la fraction FC par celle de l'extrait brut, puis multipliez par 100. Utilisez les activités totales en U du document 5, et non les activités spécifiques.

Q : Pourquoi l'EDTA diminue-t-il fortement l'activité de la kératinase ?

L'EDTA complexant les ions métalliques, il peut séquestrer le calcium nécessaire à l'activité de cette kératinase. La baisse d'activité observée est compatible avec la perte d'un ion requis pour le fonctionnement de l'enzyme.

Q : Comment organiser son temps pendant cette épreuve de deux heures ?

Répartissez le temps selon les points attribués : 3 pour la structure, 10 pour la purification et 5 pour la caractérisation, en réservant du temps pour la relecture. Soignez aussi les calculs, les schémas et la présentation.

Q : Quels éléments de présentation sont explicitement évalués dans ce sujet ?

Deux points évaluent la clarté et la rigueur de l'expression écrite, notamment l'orthographe, la grammaire et le vocabulaire, ainsi que la présentation générale de la copie et la fluidité de la lecture.

Sujet officiel associé (PDF) : https://btsbiorp.fr/assets/annales/bts-biorp/E3 - Gestion opérationnelle du laboratoire/2017/BTS BioRP - E3 - Gestion opérationnelle du laboratoire - Session 2017 - 1-Sujet.pdf
Ressources BTS BioRP : Toutes les annales & corrigés • Fiches de révision complètes • Simulateur de notes d'examen

Copyright © 2027 FormaV®. Tous droits réservés.

FormaV® est une marque déposée auprès de l'INPI sous le numéro 5227897.

Ce document a été élaboré par FormaV® avec le plus grand soin afin d'accompagner chaque apprenant vers la réussite de ses examens. Son contenu (textes, graphiques, méthodologies, tableaux, exercices, concepts, mises en forme) constitue une œuvre protégée par le droit d'auteur.

Toute copie, partage, reproduction, diffusion ou mise à disposition, même partielle, gratuite ou payante, est strictement interdite sans accord préalable et écrit de FormaV®, conformément aux articles L.111-1 et suivants du Code de la propriété intellectuelle. Dans une logique anti-plagiat, FormaV® se réserve le droit de vérifier toute utilisation illicite, y compris sur les plateformes en ligne ou sites tiers.

En utilisant ce document, vous vous engagez à respecter ces règles et à préserver l'intégrité du travail fourni. La consultation de ce document est strictement personnelle.

Merci de respecter le travail accompli afin de permettre la création continue de ressources pédagogiques fiables et accessibles.