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 :
www.formav.co/explorer

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR

BIOTECHNOLOGIES

BIOCHIMIE STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DES PROTEINES

SESSION 2017

DUREE DE L'EPREUVE : 2 h 00
COEFFICIENT : 1

Matériels autorisés : dictionnaire anglais/français, calculatrice

Tout autre matériel est interdit.

Dès que ce sujet vous est remis, assurez-vous qu'il est complet.
Ce sujet comporte 10 pages numérotées de 1/10 à 10/10.

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Kératinases, outils de valorisation des déchets kératiniques

Synthétisée et utilisée par de nombreux êtres vivants comme élément de structure, la kératine représente l'exemple-type de protéine fibreuse. C'est le constituant principal des phanères (poils, plumes, cornes, ongles, becs de nombreux animaux,…).

Les composés riches en kératine sont abondants dans la nature. Ils pourraient ainsi représenter une source de protéines et d'acides aminés et trouver des applications en tant qu'additifs alimentaires pour les animaux ou source d'azote pour les plantes. Cependant, dans la pratique, l'utilisation de tels déchets est limitée du fait de la haute résistance de la kératine à la dégradation en présence de la majorité des enzymes protéolytiques classiques.

De nombreux micro-organismes sont capables de produire des kératinases, enzymes extracellulaires à activité kératinolytique. Une biodégradation des déchets kératiniques à l'aide de tels micro-organismes pourrait représenter une méthode intéressante pour valoriser ces composés.

1. Structure et mode d'action des kératinases (3 points)

Les kératinases sont des protéases dont le mécanisme d'action n'est pas connu avec certitude. Des études récentes, ont néanmoins montré qu'elles présentent une très forte homologie avec les phosphatases alcalines. Elles sont donc aujourd'hui considérées comme des protéases à sérine.
Le document 1 présente la structure tridimensionnelle d'une kératinase bactérienne.

1.1. **Indiquer** la classe d'enzymes à laquelle appartiennent les kératinases.
Reporter sur la copie les noms des structures secondaires repérées par les numéros 1 et 2 du document 1. **Préciser** la nature des interactions stabilisant ces structures.
Indiquer la technique ayant permis de déterminer la structure de cette kératinase.

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

2. Purification de la kératinase d'*Aspergillus oryzae* (10 points)

Une souche d'*Aspergillus oryzae* isolée de sédiments marins produit une kératinase extracellulaire de 60 kDa qui présente des caractéristiques singulières. L'étude approfondie de cette enzyme nécessite au préalable sa purification.

Une production de kératinase a été réalisée grâce à la mise en culture d'une souche d'*Aspergillus oryzae* dans 50 mL de milieu pendant 5 jours à 30 °C.

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

Base nationale des sujets d'examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Les protéines de l'extrait brut obtenu sont alors séparées par précipitation différentielle au sulfate d'ammonium. Le document 2 présente les résultats de cette première étape de purification.

2.2. **Indiquer** la fraction qui doit être retenue pour la suite de la purification. **Justifier** la réponse.

La dialyse réalisée permet le dessalage des différentes fractions.

2.3. **Présenter**, sous la forme d'un schéma annoté, le principe de la dialyse.

Les protéines de la fraction dialysée, notée « FA », sont ensuite séparées par une chromatographie gel-filtration sur colonne Sephadex-75. Le chromatogramme obtenu est présenté en document 3.

2.4. **Proposer** les numéros de fractions à collecter pour la suite de la purification. **Argumenter** le choix.

Les fractions retenues sont alors regroupées et constituent la fraction « FB » qui est soumise à une chromatographie échangeuse d'ions sur colonne DEAE Sephadex-A50. Le chromatogramme obtenu est présenté en document 4.

2.5. **Expliquer** la méthode d'élution des protéines. **Proposer** une autre méthode d'élution possible.

Les fractions d'intérêt sont regroupées et concentrées par ultrafiltration afin d'obtenir la fraction « FC ».

Un fournisseur de matériels de laboratoire commercialise différentes « unités de filtration » composées de membrane ayant des seuils de coupure de 3 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa et 100 kDa.

2.6. **Proposer** parmi ces « unités de filtration », celle dont le seuil de coupure permettra la concentration de l'enzyme d'intérêt. **Argumenter** ce choix.

Le document 5 regroupe les résultats de l'évaluation de deux des étapes de la purification de la kératinase.

2.7. A partir des données de ce document, **calculer** :
- le rendement global
- le taux de purification ou enrichissement global

(équations aux grandeurs et aux valeurs numériques exigées).
Commenter les résultats du rendement et du taux de purification.

Le document 6 présente l'électrophorégramme (SDS-PAGE) obtenu pour contrôler la fraction purifiée de kératinase obtenue.

2.8. A partir du document 6**, conclure** sur la qualité de la purification et la structure de la kératinase d'*Aspergillus oryzae*.

Base nationale des Sujets d'examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

3. Caractérisation de l'activité enzymatique de la kératinase d'*Aspergillus oryzae* (5 points)

La fraction « FC » est utilisée pour étudier l'influence de différents effecteurs sur l'activité de la kératinase. Le document 7 indique les activités relatives de la kératinase en présence de différentes molécules.

3.1. **Qualifer** la nature des effets de chaque molécule testée sur l'activité kératinolytique. **Proposer** le mode d'action de l'EDTA sur l'activité de l'enzyme, sachant que la kératinase nécessite une concentration minimale en ions calcium,.

L'utilisation industrielle de la kératinase immobilisée d'*Aspergillus oryzae* est envisagée dans le cadre de la valorisation des déchets riches en kératine. Une étude préalable de sa variation d'activité après immobilisation sur différents supports est indispensable afin de choisir la gtechnique la plus adaptée. Le document 8 présente les résultats obtenus pour différentes techniques d'immobilisation.

3.2. **Identifier** le support d'immobilisation le plus approprié. **Argumenter** la réponse.

Après immobilisation de la kératinase sur ce support, la valeur de la constante de Michaelis K_M apparente est supérieure à la valeur du K_M de la forme libre de l'enzyme.

3.3. **Rappeler** la signification du paramètre cinétique K_M. **Proposer** une hypothèse expliquant l'augmentation de la valeur apparente du K_M de l'enzyme immobilisée.

Une étude de l'influence de l'immobilisation sur les propriétés enzymatiques est réalisée. Les résultats de l'influence de l'immobilisation de la kératinase sur sa stabilité thermique sont présentés dans le document 9.

3.4. **Déterminer** la « température optimale » des formes libre et immobilisée de la kératinase.

Le document 9b montre que l'immobilisation de la kératinase augmente sa stabilité thermique.

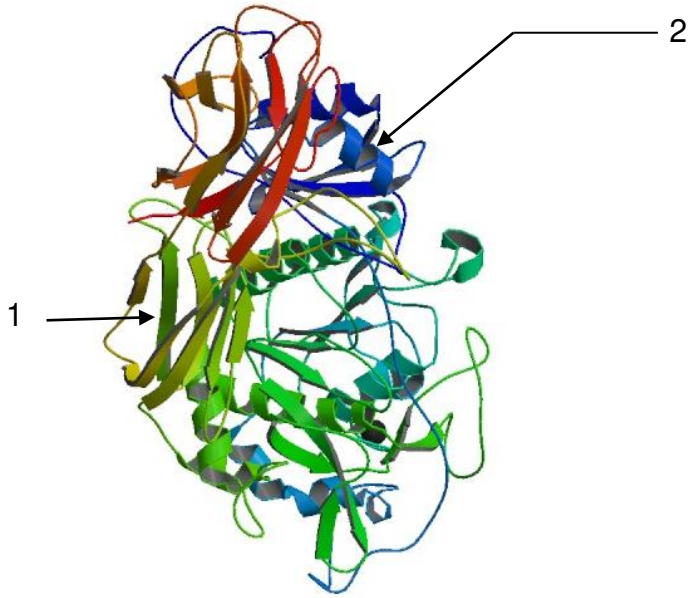
3.5. **Argumenter** cette affirmation.

Clarté et rigueur de l'expression écrite de la composition (2 points)

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

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 1 : Crystal structure of keratinase from *Fervidobacterium pennivorans*



" To understand the keratin degradation in detail, we describe the first crystal structure of a keratin-degrading enzyme (keratinase) from *Fervidobacterium pennivorans* as an immature form with propeptide (PD)-bound. The 1.7A resolution crystal structure shows that the protease is composed of four domains: a catalytic domain (CD), two beta-sandwich domains (SDs), and the PD domain. "

Kim, J.S., Kluskens, L.D., de Vos, W.M., Huber, R., van der Oost, J.
Journal: (2004) J.Mol.Biol. **335:** 787-797

Document 2 : Fractional precipitation of keratinase from *A. oryzae* cultures using ammonium sulfate

Ammonium sulfate was added to 100 mL of the crude extract at different concentrations to obtain various fractions at 25, 35, 50, 65, 75, 85 and 95 % saturation. Each precipitate was dissolved in a certain amount of distilled water and dialyzed against distilled water at 4 °C overnight.
Protein content and keratinase activity were determined on each fraction.

Agent concentration (%)	Ammonium sulfate			
	PC	RP	KA	RA
Crude	62.80	100	26.35	100
25	0.69	1.09	13.95	0.58
35	0.96	1.53	20.83	1.21
50	2.30	3.66	28.26	3.93
65	3.40	5.41	28.82	5.92
75	5.66	9.01	33.04	11.3
85	7.38	11.75	88.07	39.27
95	4.80	7.64	19.58	5.68
Total	25.19	40.09		67.89

PC: protein content (mg), RP: relative protein (%), KA: keratinase activity (U/mg protein), RA: relative activity (%).

$$RP = \frac{PC_{fraction}}{PC_{crude}} \times 100$$

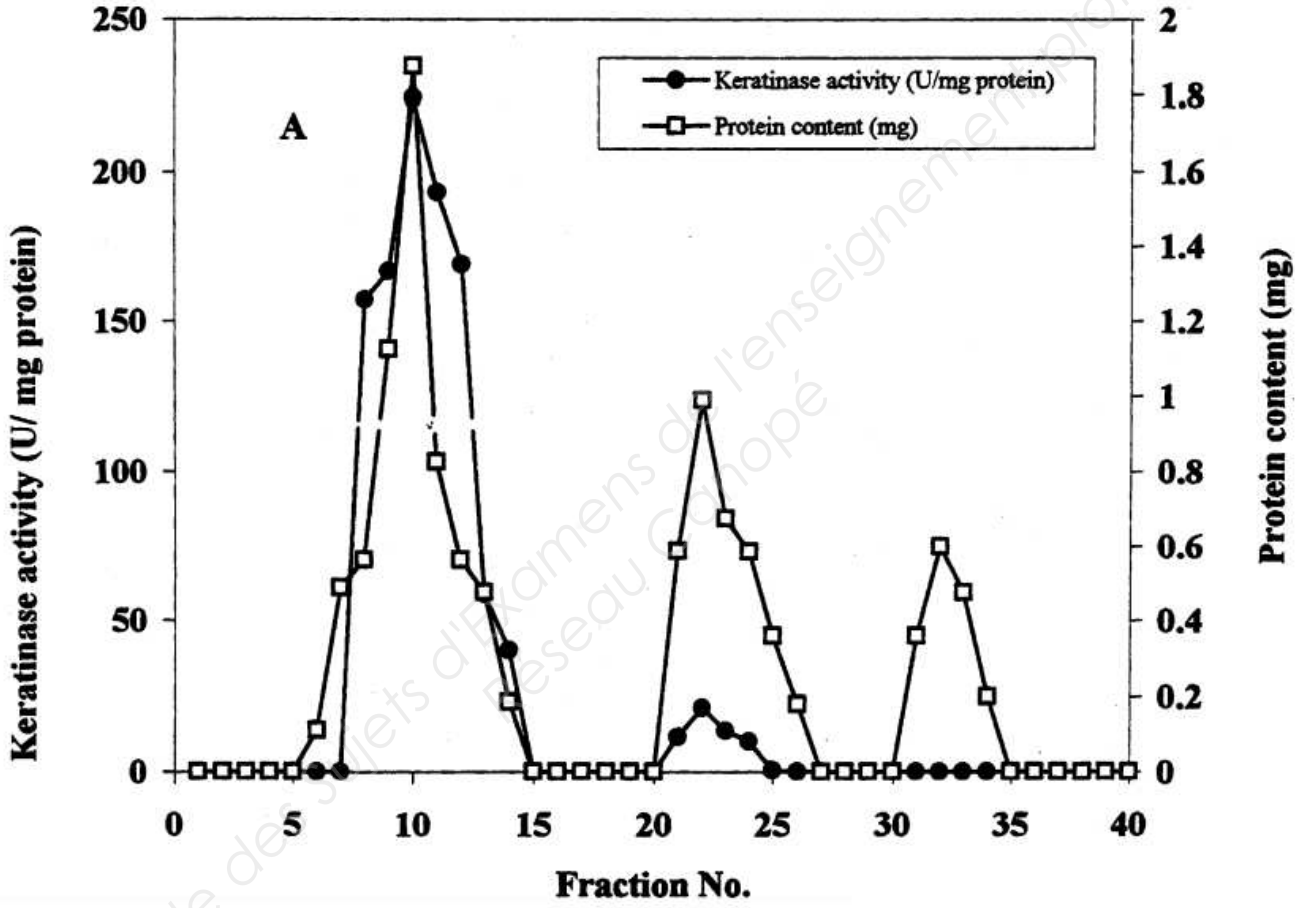
$$RA = \frac{KA_{fraction}}{KA_{crude}} \times 100$$

Base nationale des Sujets d'EXamens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

<u>Document 3 :</u> Gel filtration in Sephadex G-75 of the partially purified keratinase preparation

A glass column was packed with Sephadex G-75 and equilibrated with 400 mL of 0,02 M phosphate buffer at pH 8,0. A flow rate of 60 mL/h was maintained.
A portion (10 mL) of the interest fraction was then applied to the Sephadex G-75 gel bed and protein was eluted with 0,02 M phosphate buffer. Protein content and enzyme activity in each fraction were measured.

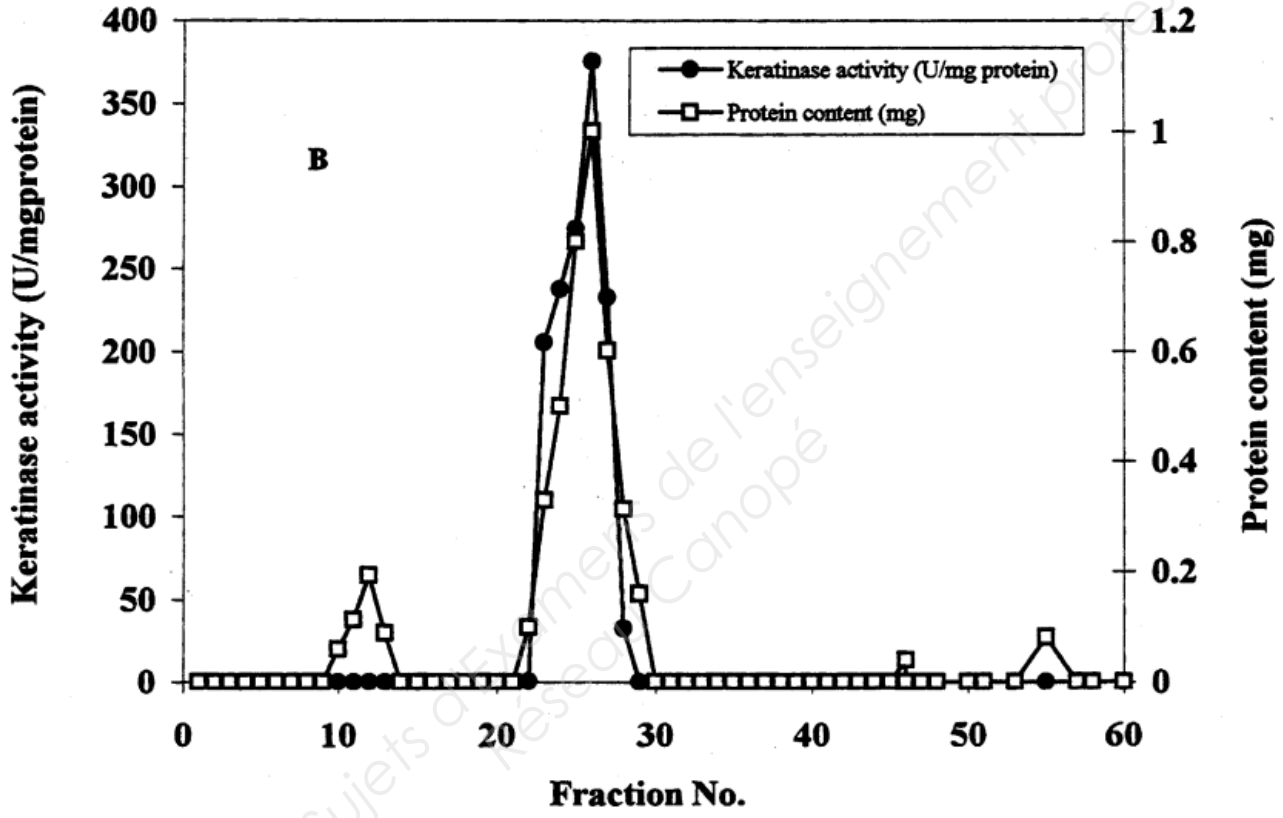
The fractions which showed hightest protein and enzyme activity were collected and pooled.



Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 4 : Ion exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 of the major activity keratinase peak obtained by gel filtration

A column was packed with a slurry of diethylaminoethyl (DEAE) Sephadex A-50 and equilibrated with 200 mL of 0,02 M phosphate buffer at pH 8,0. The fraction resulting from Gel-filtration applied to the DEAE Sephadex A-50 column. Elution was performed with 0,05 M phosphate buffer pH 8,0, followed by 0,05 M NaCl in 0,05 M phosphate buffer at pH 8,0, at a flow rate of 60 mL/h.
Fractions (5 mL) were collected, protein content and keratinase activity for each fraction were monitored.

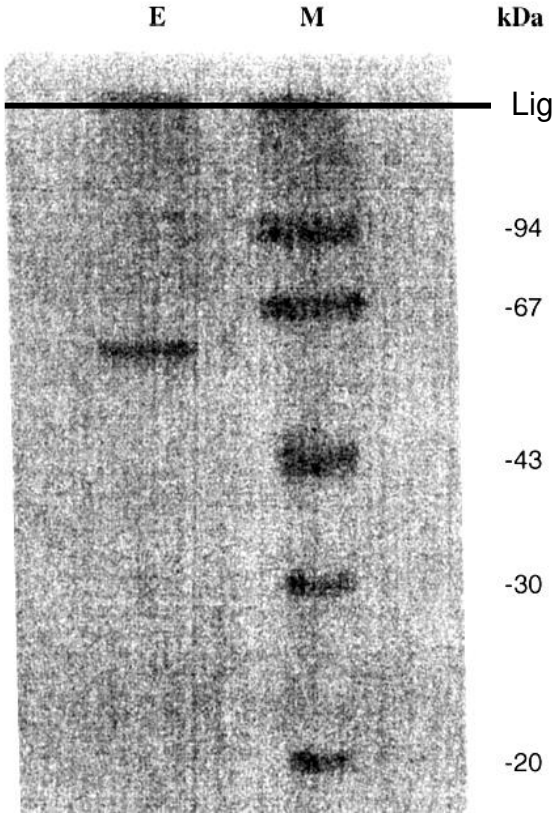


Document 5 : Evaluation de la purification de la kératinase d'*Aspergillus oryzae*

Fraction	Masse de protéines (en mg)	Activité catalytique (en U)
Extrait brut	314	8275
Fraction « FC »	9,09	2760

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Document 6 : Photographie du résultat de la SDS-PAGE (en présence de 2-mercaptoethanol) de la fraction « FC » colorée au bleu de Coomassie



Légende :

E : fraction « FC »
M : Marqueur de taille

Document 7 : Influence d'effecteurs sur l'activité enzymatique de la kératinase

Molécule testée	Activité kératinolytique relative (en %)
aucune	100,0
$CaCl_2$	170, 1
KCl	117, 3
$HgCl_2$	71,2
EDTA *	24,7

* EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

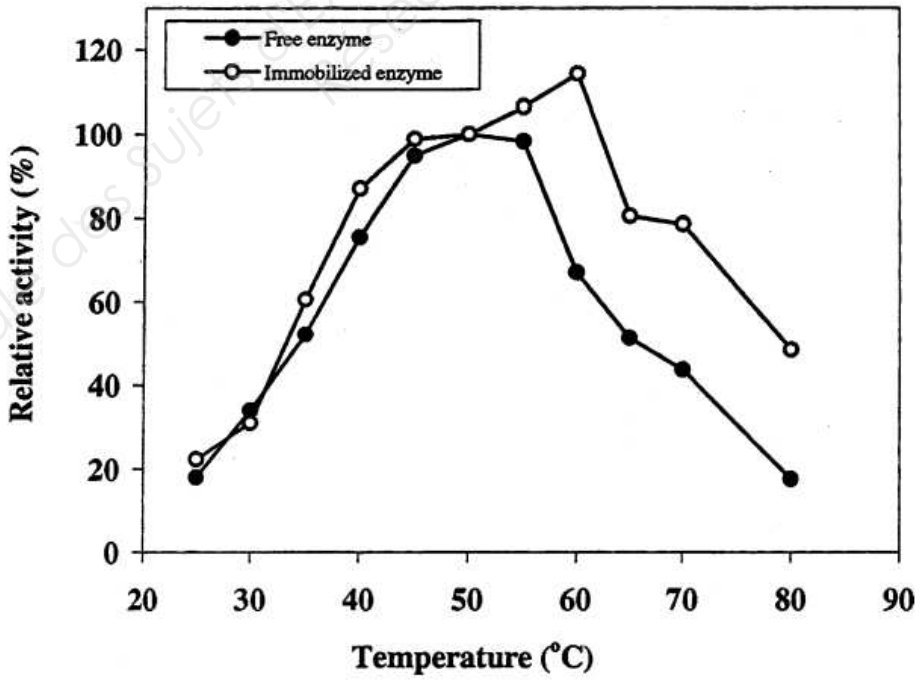
Document 8 : Caractérisation de l'immobilisation de la kératinase d'*Aspergillus oryzae* sur différents supports

L'immobilisation sur les différents supports a été réalisée avec la même quantité d'enzymes initiale.

Support d'immobilisation	Type d'immobilisation	Rendement d'immobilisation (en %)	Activité spécifique de la kératinase immobilisée (en $U.mg^{-1}$)
Gel de silice	adsorption	64,2	126,97
Billes de verre fritté	adsorption	63,6	163,33
Chitine	liaison covalente	59,2	111,76
DEAE-cellulose	adsorption ionique	56,3	104,29
Billes d'alginate	inclusion	43,0	64,00

Document 9 : Influence de l'immobilisation sur l'activité enzymatique de la kératinase d'*Aspergillus oryzae*

9a. Etude de l'activité des formes libre et immobilisée de la kératinase d'*Aspergillus oryzae* en fonction de la température

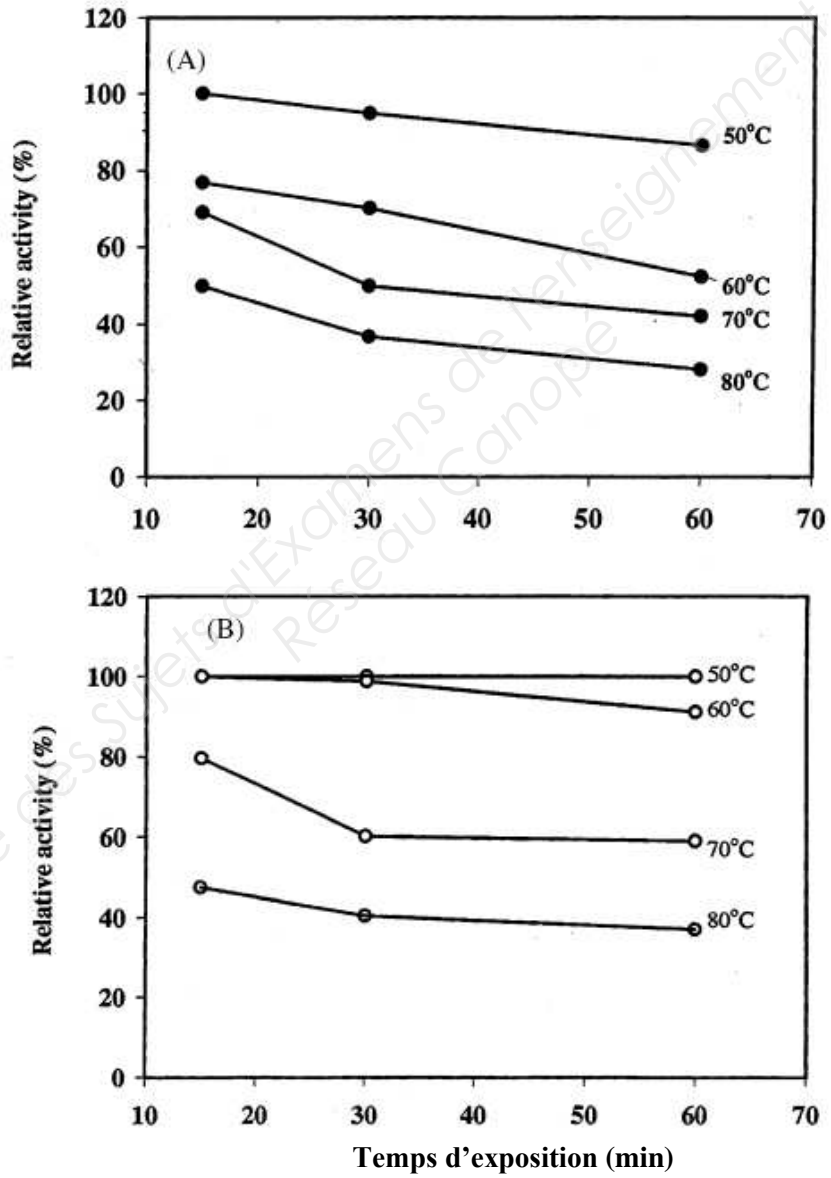


Base Nationale des sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

<u>9b.</u> Comparaison de la stabilité thermique des formes libre et immobilisée de la kératinase d'*A. oryzae*

L'étude de la stabilité thermique des formes libre et immobilisée de la kératinase a été réalisée au pH optimum de chaque forme. Des solutions enzymatiques identiques préparées en tampon phosphate ont été préchauffées séparément à différentes températures (50, 60, 70 et 80 °C) pendant des temps variables d'incubation (15, 30 et 60 min).
L'activité résiduelle a ensuite été déterminée pour chaque échantillon, après ajout du substrat, dans des conditions optimales.

(A) : enzyme libre
(B) : enzyme immobilisée



Aida M. Farag, Maha A. Hassan
Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*
Journal: (2004) Enzyme and Microbial Technology **34**: 85-93

Base Nationale des Sujets d'Examens de l'enseignement professionnel
Réseau Canopé

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

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.

Copyright © 2026 FormaV. Tous droits réservés.

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.