FORCIONE Sylvain Groupe 1  
SELIG Matthieu Promotion 45

**Activité enzymatique**

**Principe de la méthode**

Le principe de ce TP est de mettre en évidence la présence ou non de deux enzymes dans le lait étudié. On réalise ainsi 2 épreuves enzymatiques dans le but de superviser le degré de chauffage de notre lait, puisque ce chauffage désactive certaines enzymes du lait.

La première concerne la phosphatase alcaline (= PAL, grosse enzyme peu retenue) qui persiste à la chaleur un peu mieux que le germe pathogène le plus persistant. L'activité enzymatique est mesurée en se basant sur l'intensité de la coloration jaune obtenue lors de la libération du paranitrophénol après hydrolyse du paranitrophénylphosphate par la phosphatase. Pour se faire, il est nécessaire de réaliser un témoin avec du lait bouilli pour comparer aux tubes à essais préparés (substrat tamponné + lait bouilli + lait à tester agités).

La seconde concerne la péroxydase (= POD, pas retenue du tout) qui est une enzyme susceptible de catalyser les réactions entre de l'eau oxygénée et une substance incolore à l'état réduit (colorée quand il est oxydé). L'observation de la création d'une coloration indique une mise en évidence de l'activité de la péroxydase. La substance incolore choisit est le Gaïacol. (Réaction de Dupouy).  
La péroxydase n'est sensible qu'aux traitement thermiques supérieurs à 80°C (elle est détruite au-delà de ce seuil de température). Pour se faire, on introduit dans un tube à essai le Gaïacol, le lait à tester et l'eau oxygénée, la reconnaissance de l'activité de la péroxydase est repérable par l'émergence d'une coloration rouge brique.

**Discussion du résultat**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Lait/enzyme** | **1** | **2** | **3** | **5** |
| **PAL** | - | + | - | +++ |
| **POD** | - | +++ | + | +++ |

Pour la PAL, nous avons observé une coloration jaune très vive (plus que les autres laits), et pour la POD nous avons bel et bien une coloration saumon , preuve de l'oxydation du Gaïacol par l'enzyme. Ces résultats sont cohérents car un lait cru n'ayant subit aucune modification comporte forcément l'enzyme PAL puisqu'elle n'a pas été détruite par la chaleur, il en est de même pour l'enzyme POD, car si PAL est présente, POD l'est aussi forcément puisqu'elle est censée être plus résistante à la chaleur que PAL. Les recherches plus approfondies confirment le fait qu'il est normal de retrouver ces 2 enzymes dans un lait cru puisqu'il n'a encore subit aucune exposition à des chaleurs inhabituelles.

**Rôle de l'élément dosé**

La présence de la PAL révèle une pasteurisation incorrectement réalisée.  
La présence de la POD permet de savoir si le traitement U.H.T. du lait a correctement été opéré. Si c'est le cas, le lait pourra porter l'appellation "frais", et si ce n'est pas le cas il portera la mention "pasteurisation haute".  
  
La phosphatase alcaline est généralement présente dans le sang et partiellement détruite par la bile. Elle a un rôle dans la minéralisation des os et est aussi présente dans les tissus du corps mais aussi dans des organes plus ciblés tels que le foie ou les reins. Elle a un intérêt biologique de par le fait qu'elle constitue un marqueur de nombreuses maladies puisqu'il s'agit d'une enzyme sérique, mais aussi car elle permet de déphosphoryler ARN et ADN. De plus, elles jouent un rôle dans le transport de métabolites via les membranes cellulaires.  
Des anémies ou insuffisances hépatiques sont l'effet d'une baisse de l'activité de l'enzyme, à contrario, des cancers localisés ou maladies osseuses sont la conséquence d'une hausse de l'activité de la phosphatase alcaline.

La péroxydase est couramment utilisée en tant qu'agent antimicrobien (de conservation) pour le lait ou pour le traitement des fruits. Elle se trouve généralement dans la salive, les plaques buccales ou les globules blancs, et sert aussi dans des domaines tels que la coloration/décoloration et l'immunité.

**Bibliographie :**[*http://fr.wikipedia.org/wiki/Lactoperoxydase*](http://fr.wikipedia.org/wiki/Lactoperoxydase)[*http://www.economie.gouv.fr/files/directions\_services/daj/marches\_publics/oeap/gem/produits\_laitiers/5.1.1.2.pdf*](http://www.economie.gouv.fr/files/directions_services/daj/marches_publics/oeap/gem/produits_laitiers/5.1.1.2.pdf)[*http://www.er.uqam.ca/nobel/c3542/ghassan/introduction.htm*](http://www.er.uqam.ca/nobel/c3542/ghassan/introduction.htm)[*http://esilrch1.esi.umontreal.ca/~syguschj/cours/BCM1502/Web-Notes/5b\_Phosphatase\_alkaline\_suppl.pdf*](http://esilrch1.esi.umontreal.ca/~syguschj/cours/BCM1502/Web-Notes/5b_Phosphatase_alkaline_suppl.pdf)[*http://fr.wikipedia.org/wiki/Phosphatase\_alcaline*](http://fr.wikipedia.org/wiki/Phosphatase_alcaline)[*http://www.ac-grenoble.fr/disciplines/sti-biotechnologies/articles.php?pg=65*](http://www.ac-grenoble.fr/disciplines/sti-biotechnologies/articles.php?pg=65) *Le contrôle d'hygiène du lait liquide, Franklin W Barber, B.S., M.S. Ph.D.*