

Sujet Olof Mellander

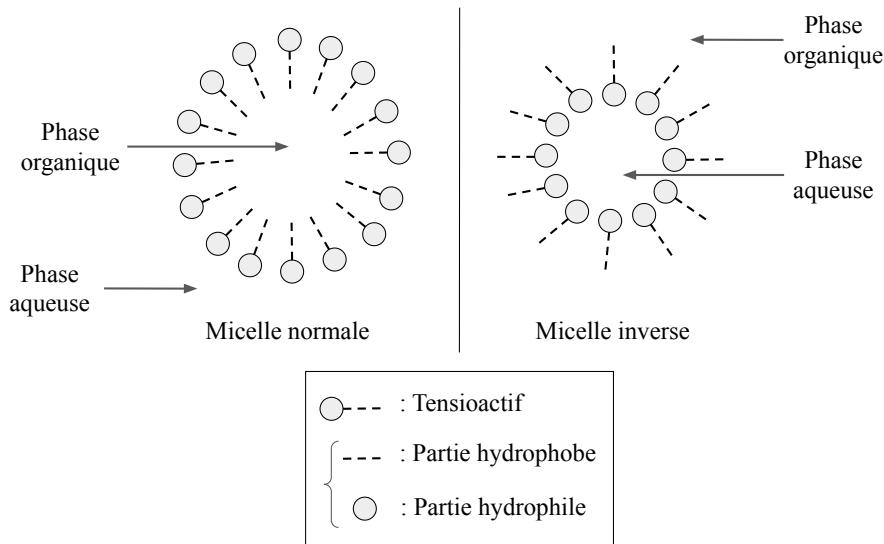
Cette partie s'intéresse à la **composition du lait** et à sa **cinétique de coagulation**. La coagulation correspond à la transformation d'un liquide en une phase solide. L'aspect trouble du lait provient d'une émulsion de **micelles de caséines** dans de l'eau. Les caséines sont des protéines (assemblage de plusieurs acides aminés suivant des liaisons peptidiques) qui se répartissent essentiellement en trois types. Les caséines α et β , hydrophobes et la caséine κ qui agit en tant que tensioactif.



Données :

- $pK_A (H_3PO_4 / H_2PO_4^-) = 2,1$
- $pK_A (H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}) = 7,2$
- $pK_A (HPO_4^{2-} / PO_4^{3-}) = 12,4$
- $pK_A (\text{acide lactique/lactate}) = 3,9$
- Masse molaire de l'acide lactique : $M_l = 90,1 \text{ g.mol}^{-1}$
- $R = 8,31 \text{ J.mol}^{-1} \cdot K^{-1}$

Deux types de structure de micelles existent et sont présentées sur le schéma ci-dessous.

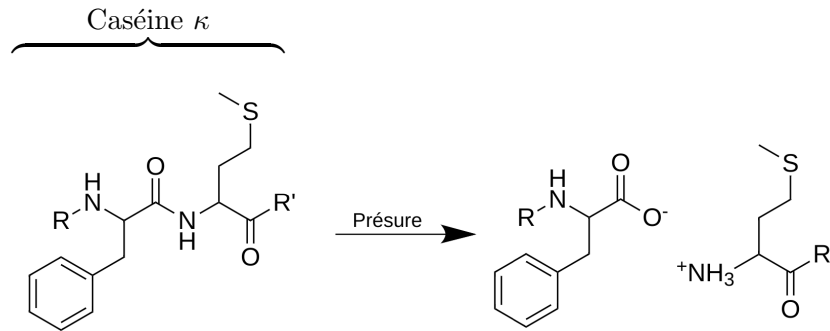


1. Proposer un schéma d'une micelle de caséines dans le lait. On fera intervenir les caséines α , β et κ ainsi que les molécules d'eau. La micelle de caséine est-elle une micelle normale ou inverse ?

La **coagulation de caséines** est responsable de la coagulation du lait pour former du fromage. La première coagulation du lait aurait été effectuée par accident, en Mésopotamie, lorsqu'un homme transportait du lait dans une vessie de ruminant pour office de sac. Cela s'explique par la présence de protéines de **présure** contenues dans la vessie. La présure est un mélange de deux enzymes (protéines ayant des propriétés catalytiques) qui augmentent la vitesse de coagulation de caséines. En effet, en présence de présure, la caséine κ se scinde en deux parties : une para-caséine κ totalement hydrophobe qui précipite et constitue une partie du lait caillé, et un caséinomacropéptide, totalement hydrophile qui reste en phase liquide et constitue le petit-lait.

2. Interpréter la coagulation des caséines en présence de présure. On indiquera dans quelles phases se retrouvent les différentes caséines.

Sous l'action de la présure, la caséine κ est scindée en deux par une réaction d'hydrolyse de la liaison peptidique entre les acides aminés Phénylalanine et Méthionine. L'hydrolyse de la caséine peut se représenter comme suit :



Une équipe de l'INRA a étudié en 1963 la **cinétique** de l'hydrolyse de la caséine κ catalysée par la présure¹. Les expérimentateurs ont suivi l'évolution de la réaction par pH-métrie. Le pH-mètre utilisé est un pH-mètre de précision étalonné à partir d'une solution tampon phosphate de pH égal à 7,0. La solution tampon est un mélange d'ions HPO_4^{2-} et H_2PO_4^- .

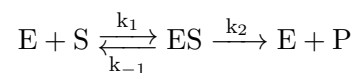
3. Définir une solution tampon. Quelle est, en général, la composition d'une solution tampon ?

1. *Etude cinétique d'une protéolyse limitée : action de la présure sur la caséine*, J. Garnier, (1963), *Biochimica et Biophysica Acta*

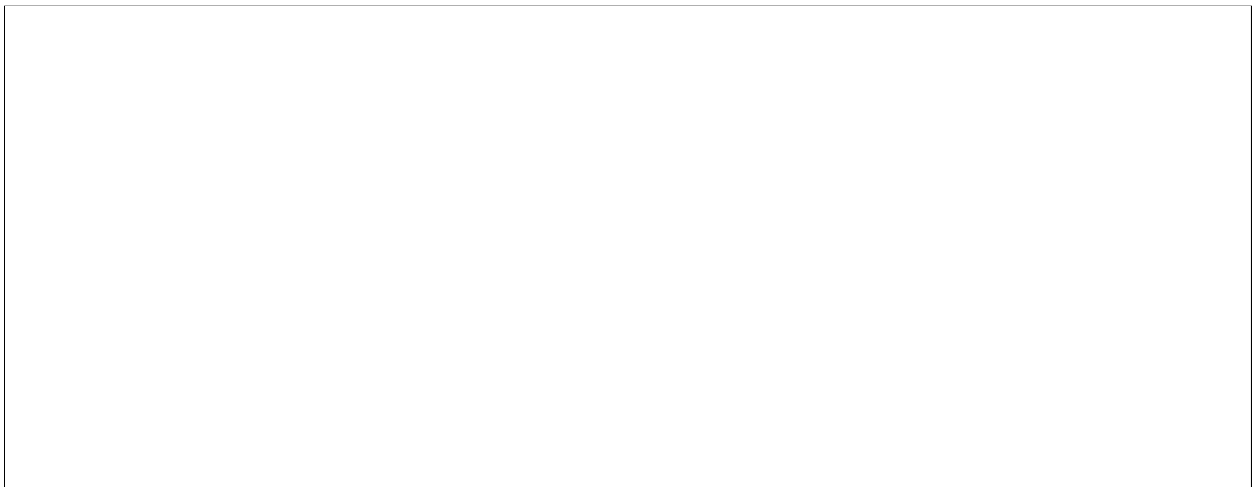
4. Représenter le schéma de Lewis de l'ion HPO_4^{2-} (aussi noté $(\text{HO})\text{PO}_3^{2-}$). En quelles proportions les espèces HPO_4^{2-} et H_2PO_4^- doivent être présentes dans la solution tampon pour fixer le pH à 7,0?



Pour modéliser la cinétique de la catalyse enzymatique, le **modèle de Michaelis-Menten** peut être utilisé. Le substrat est noté S, l'enzyme E. Ce modèle stipule que la réaction se produit au sein d'un complexe enzyme-substrat noté ES. On considère que le complexe ES ne s'accumule pas dans le milieu. k_1 , k_{-1} et k_2 sont les constantes de vitesse de formation ou de disparition du complexe enzyme-substrat ES suivant le schéma ci-dessous :



5. Indiquer quelles espèces font office de substrat et d'enzyme dans l'étude considérée.

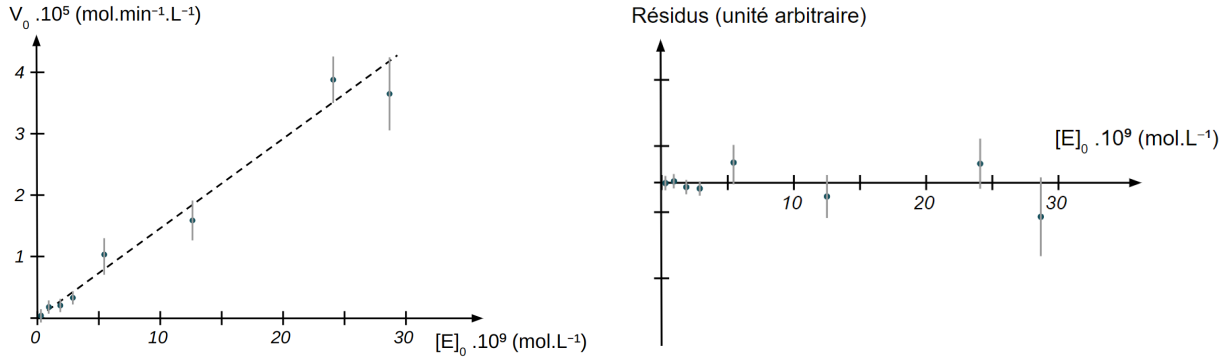


6. Justifier que l'on puisse appliquer l'approximation des états quasi stationnaires au complexe enzyme-substrat ES. En expliquant le raisonnement, montrer que la vitesse de formation du produit P peut s'exprimer comme ci-dessous. Expliciter l'expression de la constante K_M en fonction des constantes de vitesse. On écrira dans le raisonnement l'équation traduisant la conservation de matière totale de l'enzyme, en notant $[E]_0$ sa concentration initiale.

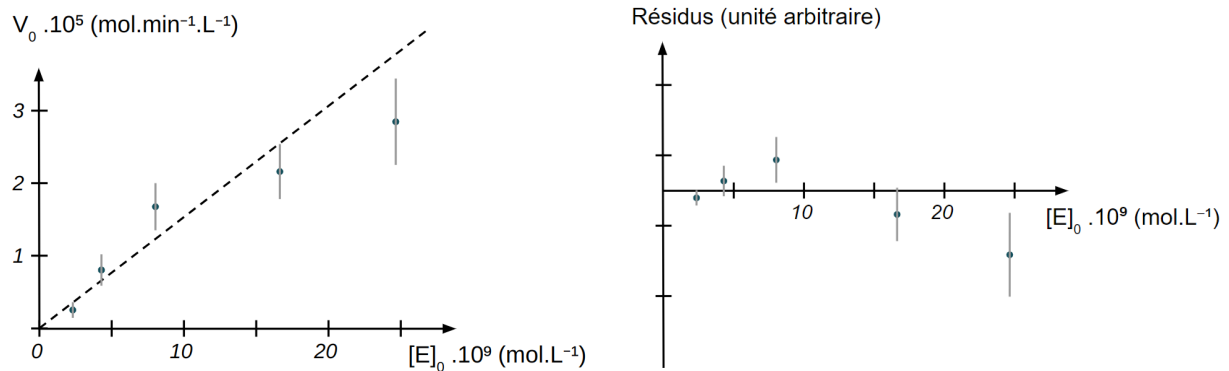
$$V = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_M}{[S]}} \quad \text{avec} \quad V_{max} = k_2 \cdot [E]_0$$

Afin de vérifier la relation démontrée question 6, les expérimentateurs ont étudié l'évolution de la vitesse initiale V_0 (correspondant à l'extrapolation de v à $t = 0$) en fonction de la concentration initiale en enzyme $[E]_0$. La concentration initiale en caséine est de $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Les régressions linéaires des séries de données obtenues pour 298 K et 308 K sont présentées ci-dessous. Les points expérimentaux sont munis de leurs incertitudes de mesure (en gris). Ces incertitudes correspondent à deux écarts-types associés à chaque mesure. En pointillé est représentée la droite de régression linéaire.

Expériences réalisées à 298 K :

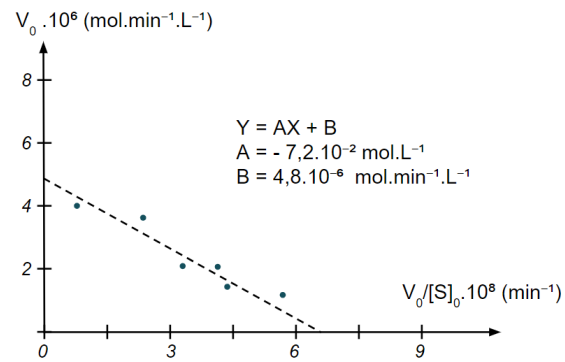


Expériences réalisées à 308 K :



7. Commenter la validité du modèle linéaire à 298 K et à 308 K au vu des informations fournies sur les figures ci-dessus.

Afin de déterminer les constantes K_M et k_2 , l'équipe expérimentale a représenté graphiquement les vitesses initiales V_0 en fonction du quotient $V_0/[S]_0$. Ci-dessous est présenté le graphe de l'expérience réalisée à 298 K pour une concentration en enzyme initiale de $3,2 \cdot 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$.



8. En utilisant l'expression de V_{max} et du graphe présenté ci-dessus, déterminer la valeur de K_M et de k_2 (en s^{-1}) à 298 K.

Afin de déterminer l'énergie d'activation associée à la constante k_2 , la précédente mesure a été réalisée pour différentes températures. Les mesures des constantes $k_2(T)$ sont regroupées dans le tableau ci-dessous.

T (K)	k_2 (s ⁻¹)
298	Question 8
308	36
313	46

9. Déterminer l'énergie d'activation (en kJ.mol⁻¹) associée à la constante k_2 à partir des données expérimentales.

D'autres molécules du lait peuvent être dégradées par l'action de bactéries lors de la fermentation. C'est par exemple le cas du lactose qui peut être dégradé en acide lactique. Cette transformation est notamment utilisée dans la fabrication des yaourts.

L'acidité du lait est due d'une part aux protéines et minéraux initialement présents dans le lait, d'autre part à la production d'acide lactique par les ferments lactiques. Il s'agit ainsi d'un indicateur de la fraîcheur du lait : le lait s'acidifie au cours du temps. L'acidité du lait est mesurée en degrés Dornic : $1,0^\circ\text{D}$ correspond à une concentration en masse équivalente à $0,10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ d'acide lactique. Un lait de vache frais possède une acidité comprise entre 16 et 18°D .

Le titrage d'un volume $V_0 = 50,0\text{ mL}$ de lait de vache par de la soude de concentration $c_1 = 0,10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ a été réalisé et la courbe de titrage suivante a été obtenue. Les ions hydroxyde réagissent avec l'ensemble des acides présents dans le lait. Pour simplifier l'étude, on considèrera la réaction d'une unique espèce, notée AH, avec les ions hydroxydes : $\text{AH} + \text{OH}^- = \text{A}^- + \text{H}_2\text{O}$. On associe à cette transformation une constante thermodynamique K° assez élevée pour considérer la réaction de titrage totale.

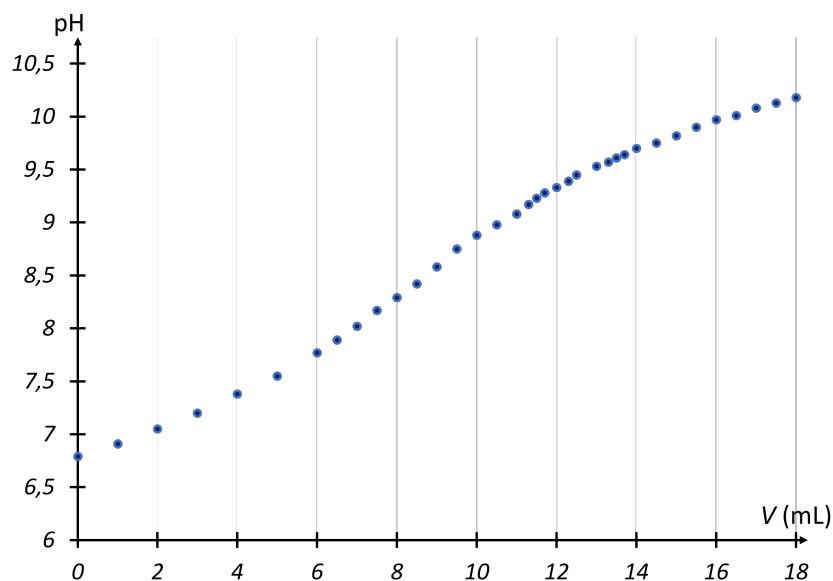
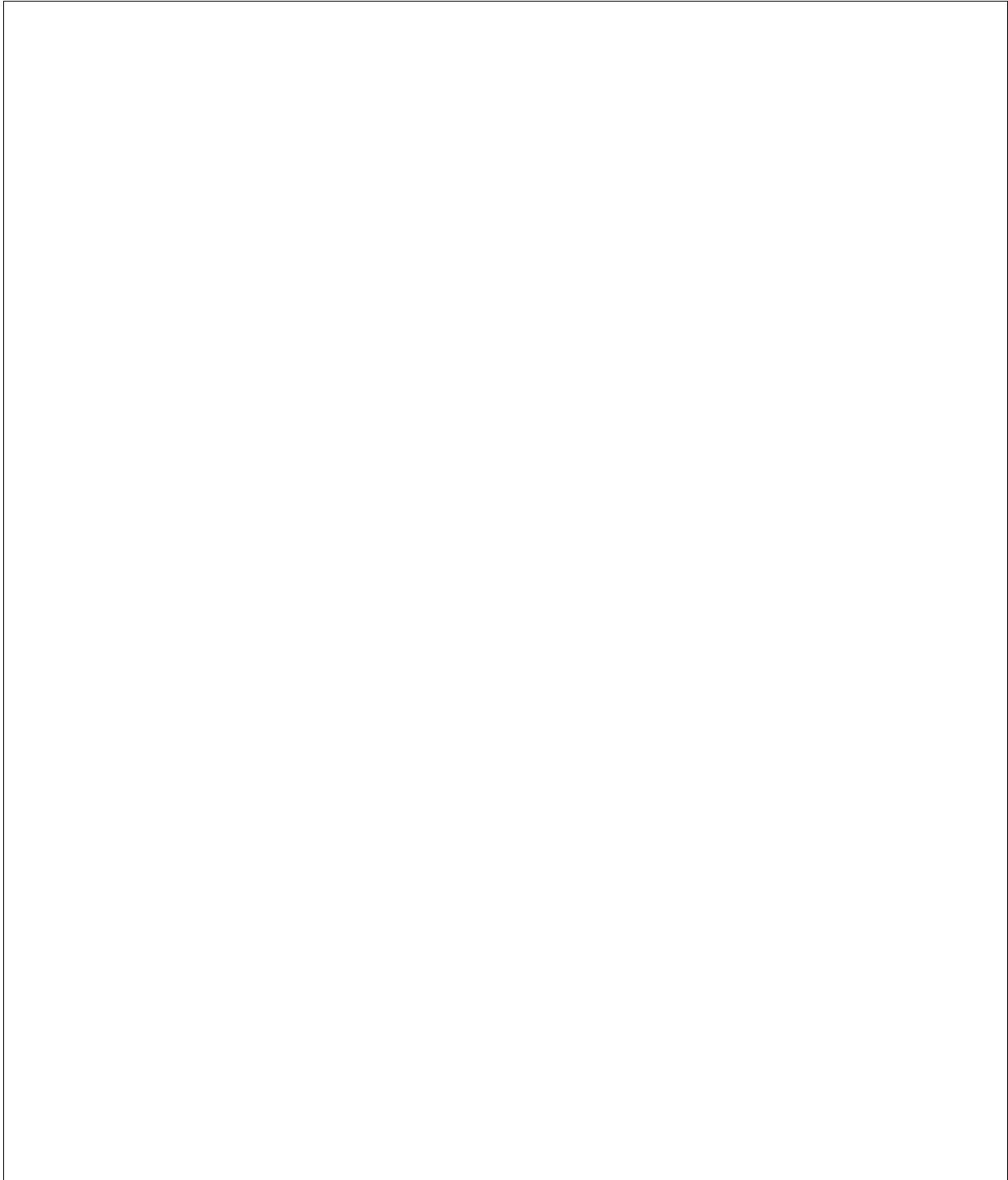


FIGURE 1 – Courbe de titrage pH-métrique d'un lait de vache par de la soude à $c_1 = 0,10\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

10. Indiquer pourquoi on ne peut appliquer à la courbe de titrage donnée FIGURE 1 les méthodes traditionnelles (méthode des tangentes, méthode de la dérivée) de détermination du volume de fin de titrage.

11. Pour déterminer le volume de fin de titrage, on utilise la méthode de Gran qui consiste à tracer la fonction $[\text{H}_3\text{O}^+] \times V$ en fonction de V juste avant l'équivalence, où V est le volume de soude ajoutée. Montrer que la fonction à tracer est une fonction affine.



La courbe de Gran suivante est obtenue :

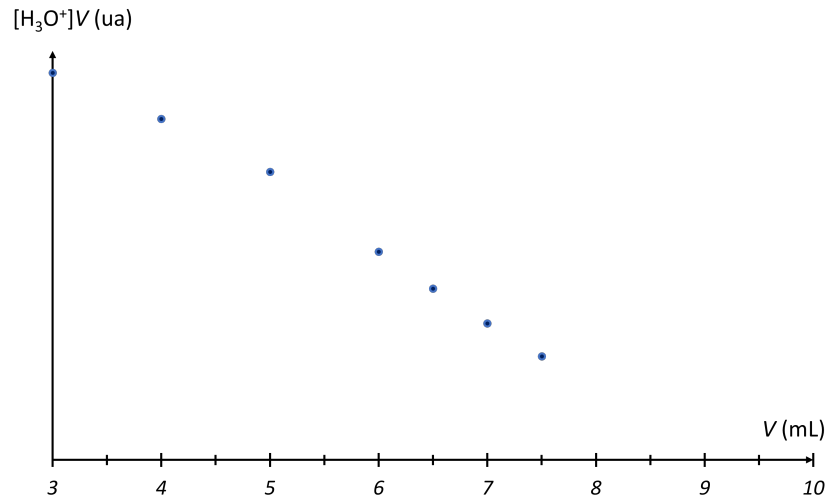


FIGURE 2 – Courbe de Gran $[\text{H}_3\text{O}^+] \times V = f(V)$ pour le titrage pH-métrique d'un lait de vache par une solution de soude à $c_1 = 0,10 \text{ mol.L}^{-1}$.

12. Proposer une méthode permettant de lire le volume de fin de titrage V_{eq} sur la courbe de Gran. En déduire la valeur de l'acidité Dornic du lait étudié. Conclure.