

Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de Microbiologie

3^{ème} année Licence Microbiologie

Equipe : Pr Boucherba Nawel, Dr Djinni Ibtissem, Dr Ben Houla Mohammed et deux doctorants du LMA

TP : Purification de lipases produites par une souche d'actinomycète

Objectif : Suivre un protocole de purification : de la fermentation de la souche à la purification sur chromatographie d'exclusion avec une démonstration (mise en place d'une électrophorèse de type SDS-PAGE)

Etape 1 : Explications sur la méthodologie de préparation des tampons

Etape 2 : centrifugation d'un milieu de production de lipases : Le bouillon de culture (1 ml) est centrifugé à 4000 rpm pendant 30 min dans des tubes Eppendorf

Etape 3 : test d'activité lipasique

- le milieu réactionnel est préparé dans des Erlenmeyers : 0,5 ml de surnageant est additionné à un mélange préparé par 5 ml d'huile d'olive émulsionnée dans la gomme arabique à 10 % (p/v), 5 ml de tampon phosphate à 0,2 mol/L et à pH 7.

Parallèlement, le témoin est préparé en remplaçant le surnageant par 0,5 ml d'eau distillée. Le milieu réactionnel et le témoin sont incubés dans un bain Marie. Après 30 min, la réaction est stoppée et les acides gras libres AGL sont extraits par l'ajout de 1 ml de la solution acétone-éthanol (v/v) puis tourbillonnant le contenu rapidement. 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine (comme indicateur coloré de pH) sont additionnées à chaque mélange réactionnel et au témoin, ensuite ils sont titrés par une solution de NaOH à 0.1 N Jusqu'au changement de couleur vers le rose claire à pH neutre.

L'activité lipolytique est calculée selon la formule :

$$\text{Activité } (\mu\text{mol/l. min}) = (V_s - V_B) \cdot N \cdot 1000 / V_R \cdot T$$

VS : volume de NaOH consommé pour le titrage de volume réactionnel.

VB : volume de NaOH consommé pour le titrage de témoin (blanc).

N : normalité de NaOH.

1000 : facteur de conversion de mmol au μmol .

VR : Volume du surnageant

T : Temps de la réaction

Etape 4 : concentration du surnageant moyennant des centricons (cut off 3KDA)

Etape 5 : Elution sur résine (chromatographie échangeuse de cations)

- Equilibrer la colonne avec 2 fois son volume
- Régler le débit à 2ml/min
- Injecter 8 ml de surnageant concentré
- injecter la phase mobile (solutions de NaCl 0,1M et 0,3M)
- collecter 15 fractions pour chaque dans des tubes à hémolyse (2ml dans chaque tube)
- Lecture d'absorbance à 280 nm

Etape 6 : démonstration de la mise en route d'une électrophorèse dénaturante « SDS-PAGE »

NB : Port de blouse obligatoire, chaque étudiant doit avoir un marqueur indélébile, scotch et des étiquettes (petit format)

Questions

1. Pourquoi une étape de centrifugation a été effectuée ?
2. Expliquer comment préparer la solution tampon phosphate nécessaire pour la réalisation de l'étape 3 ?
3. Calculer l'activité lipasique
4. En quoi consiste l'équilibrage de la colonne ?
5. Pourquoi avoir effectué l'absorbance des fractions à 280 nm ?
6. Tracer les courbes $DO=f(\text{Fractions})$, qu'elles conclusion pouvez-vous tirer ?
7. Rappeler le principe de l'électrophorèse dénaturante SDS-PAGE en donnant le rôle du SDS ?

Bon courage à toutes et à tous