

Université Abderrahmane Mira-
Faculté SNV- Département BPC
TD 1 Enzymologie Appliquée (M2 Biochimie Appliquée (2019-2020))

Exercice 1 :

Le tableau suivant sert à montrer le rôle et l'efficacité de chaque étape dans le processus de purification. Interpréter les résultats.

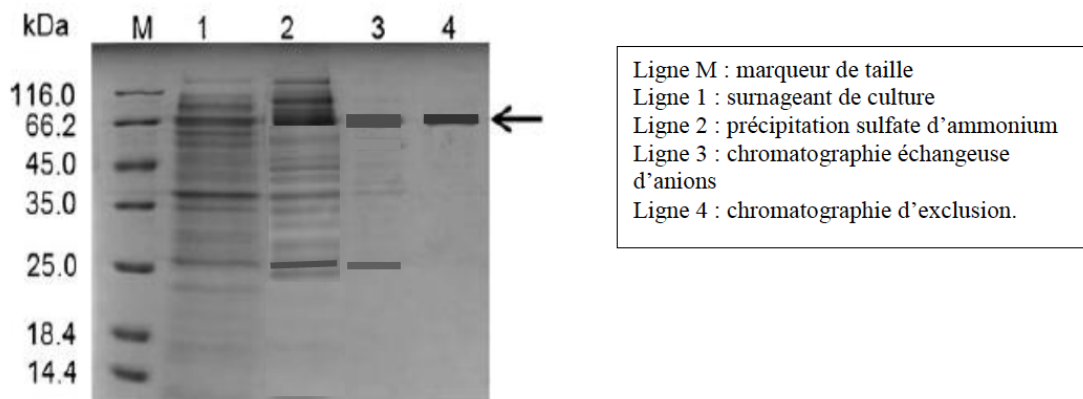
Étape	Protéines totales (mg)	Activité totale (U)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement (%)
Homogénat initial	600	6000			
Surnageant	150	3750			
Fraction 20-50% sat. (NH ₄) ₂ SO ₄	40	2500			
Chromatographie d'échange ionique	8	2000			

Exercice 2

Purification et caractérisation d'une enzyme bactérienne E sécrétée par *Bacillus halodurans*. L'enzyme E est purifiée à partir du surnageant de culture débarrassé des bactéries par centrifugation selon un protocole contenant trois étapes (Table 1). Le surnageant de culture centrifugé est soumis à une précipitation au sulfate d'ammonium. Le précipité est récupéré par centrifugation, resolubilisé, dialysé contre un tampon Tris-HCl 50 mM pH 9 (tampon A) et chargé sur une colonne de DEAE-cellulose (chromatographie échangeuse d'anions) (figure 1). L'élution des protéines est réalisée à l'aide d'un gradient de 0 à 1 M NaCl dans le tampon A. Les fractions contenant l'enzyme sont regroupées, concentrées et chargées sur une colonne de séphadex G50 équilibrée en tampon A (chromatographie d'exclusion). L'élution des protéines est réalisée avec le tampon A. Les fractions contenant l'enzyme sont regroupées et constituent le pool d'enzyme purifiée. Les fractions issues des différentes étapes de purification sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (figure 2).

Étapes		Activité enzymatique totale (U)	Quantité de protéine totale (mg)	Activité spécifique (U/mg)	Facteur de purification	Rendement de purification (%)
Surnageant centrifugé	culture	1413	673			
Précipitation d'ammonium	sulfate	1215	308			
Chromatographie échangeuse d'anions		438	17,4			
Chromatographie d'exclusion		342	10			

Figure 2 : Analyse des étapes de purification par électrophorèse en conditions dénaturantes.



- 1- Rédigez une fiche technique résumant les différentes étapes du protocole.
- 2- Compléter la table 1. Quels commentaires à propos de l'efficacité des différentes étapes pouvez-vous faire ?
- 3- Analyser la figure 2. Quelle information avez-vous concernant la masse molaire de l'enzyme ?