

## TD 4 EAGE : Production des enzymes

### Exo 1 :

Après la séparation cellulaire on obtient une solution qui contient les protéines suivantes : la procédure ci-dessous a été suggérée comme moyen possible de purifier le produit souhaité - La protéine B-. Répondez aux questions sur chaque étape du processus de purification.

| Protéine | Solubilité dans le Sulfate d'Ammonium (SA) |        |        | Pi  | PM (g) |
|----------|--|--------|--------|-----|--------|
|          | 30% SA                                     | 50% SA | 80% SA |     |        |
| B        | 100  | 100    | 0      | 6   | 55000  |
| C        | 50   | 30     | 0      | 4   | 25000  |
| D        | 70   | 50     | 20     | 9   | 26000  |
| E        | 0  | 0      | 0      | 6.6 | 90000  |
| F        | 100  | 100    | 0      | 6   | 35000  |
| G        | 75   | 60     | 50     | 5.5 | 14000  |
| H        | 100  | 100    | 0      | 6   | 75000  |
| I        | 30   | 0      | 0      | 6   | 105000 |

Etape 1 : précipitation par sulfate d'ammonium

a- 50 % SA

b- 80 % SA

- Après une coupe de 50% SA, où est votre produit désiré ; culot ou surnageant ?
- Quelles protéines ont été complètement éliminées par la précipitation au sulfate d'ammonium ?
- Quelles protéines ont été partiellement éliminées ?
- Quelle protéine reste encore après cette étape ?

Etape 2 : Vous effectuez après cette étape une précipitation au pH 6

- Où se trouve votre protéines d'intérêt ? culot ou le surnageant
- Citez les protéines qui seront dans le culot et dans le surnageant.

Etape 3 : Pour purifier la protéines B, on effectue une chromatographie d'exclusion moléculaire (Filtration sur gel)

- Donnez l'ordre d'élution des protéines.

**Répondez sur les mêmes questions pour la concentration 80% SA**

**Exo 2 :**

Proposer un protocole de purification d'une enzyme de poids moléculaire 24 kDa et de pI 5.5 et qui est contaminée par deux autres protéines, l'une de masse moléculaire analogue et de pI 7.0, et l'autre de poids 100 kDa et de pI 5.4.

**Exo 3 :**

Un mélange de trois enzymes : A1 (pHi = 2,87), A2 (pHi = 10,76) et A3 (pHi = 6), est soumis à une chromatographie sur colonne échangeuse de cations, les acides aminés sont chargés sur la colonne à pH = 2.

- Quelle est la charge des enzymes à pH 2

L'élution est effectuée à l'aide d'un tampon à pH = 6.

- Dans quel ordre peut-on prévoir la sortie de ces enzymes ?

**Exo 4 :**

La diéthylaminoéthylcellulose (DEAE-cellulose) est un support échangeur d'anions, obtenu en substituant la cellulose par des groupements diéthylaminoéthyls (On considérera que le pK de l'amine tertiaire du groupement DEAE est 9,4):

CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

/

-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- NH<sup>+</sup>

\

CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>

2 - Parmi les protéines suivantes : Sérumalbumine (pHi = 4,9), Uréase (pHi = 5), Chymotrypsinogène (pHi = 9,5), quelles sont celles qui, à pH 7, sont retenues par la DEAE-cellulose ? (On considérera que les interactions protéine-DEAE-cellulose sont uniquement de type électrostatiques).

- Que se passe-t-il si on utilise un tampon de pH 10 pour préparer la colonne de DEAE ???

**Exo 5 :**

Une enzyme a été purifiée en trois étapes, en partant de 1000 g d'un extrait brut contenant au total 20000 unités de cette enzyme.

1 - Compléter le tableau ci-dessous :

|                            | protéine (g) : | activité (UE) : | taux de purification : | rendement : |
|----------------------------|----------------|-----------------|------------------------|-------------|
| Extrait brut               | 1000           | 20000           |                        |             |
| Chromato. d'exclusion      | 200            | 14000           |                        |             |
| Chromato. d'échange d'ions | 15             | 4500            |                        |             |
| Chromato. d'affinité       | 0.5            | 3500            |                        |             |

2 - Quelles conclusions peut-on tirer de cette étude ?