

# Module M 57

## Chapitre 7

### Technique de production d'une molécule d'intérêt et purification.

Produire des molécules équivalentes à celles issues du pétrole à partir d'autres biais est un vrai défi à relever. Il en devient d'autant plus intéressant quand ces molécules peuvent être produites à partir de matière renouvelable sous-valorisée. L'utilisation de la bactérie permet de produire des molécules bio-sourcées, telles que le bioéthanol, à partir de biomasse non alimentaire.

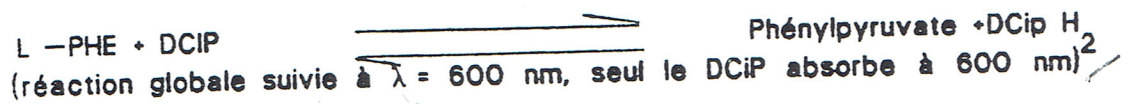
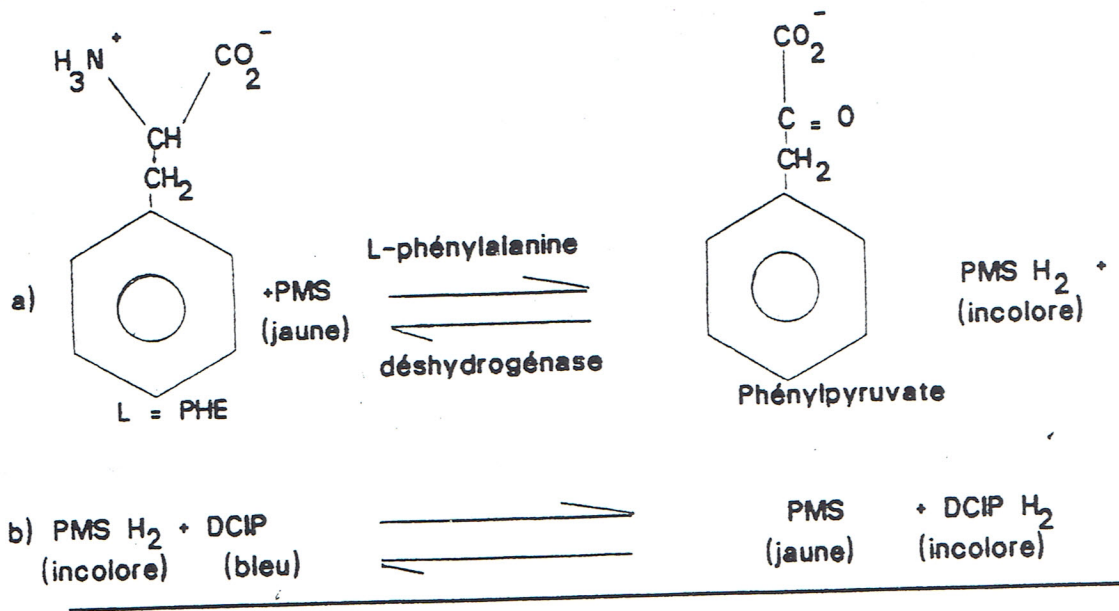
I Schéma d'une production en bioréacteur.

II Comprendre la notion de purification

III Exemple d'exercice de purification, en lien avec l'enzymologie

Exercice 3

A) On mesure l'activité de la L-phénylalanine déshydrogénase par la réduction du DCiP (dichlorophénol indophénol) en présence de l'enzyme (le DCiP est un accepteur artificiel d'électrons). La réaction est suivie par la diminution d'absorbance à 600 nm :



Le mélange réactionnel contient :

- 0,5 ml de L-phénylalanine M/10
- 0,44 ml de tampon Tris - maléate  $2 \cdot 10^{-2}$  M pH 7,5 additionné du sel  $MgCl_2 \cdot 10^{-2}$  M
- 50  $\mu$ l de PMS (phénazine méthosulfate)  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$
- 10  $\mu$ l de DCiP  $2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

le poids moléculaire du PMS est  $PM = 306$ , celui du DCiP  $PM = 290$

$v_T = \ln P$

1°) Calculer les quantités de PMS et de DCiP présentes dans le milieu réactionnel ainsi que leurs concentrations finales respectives.

2°) La réaction enzymatique est démarrée par addition de 1  $\mu$ l de L-Phénylalanine déshydrogénase diluée au 1/400e. Sachant que le coefficient d'extinction du DCiP à 600 nm est de  $16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , calculer l'activité de 1 ml d'enzyme non diluée, lorsque l'absorbance, suivie pendant 2 minutes, décroît de 0,8 à 0,52.

Rédaction des gabines

modèle H57

Procedé d'essai

B) On dépose 14 ml d'un mélange enzymatique complexe contenant de la L-Phénylalanine déshydrogénase sur une colonne de DEAE-sépharose (colonne échangeuse d'anions). La fraction déposée a une concentration en protéines de  $0,095 \text{ mg. ml}^{-1}$ . L'activité de la L-Phénylalanine déshydrogénase mesurée sur  $25 \mu\text{l}$  donne une variation d'absorbance à 600 nm, de 0,065 par minute. Cette enzyme est éluée spécifiquement par un gradient de force ionique croissante (KCl), on récupère 13 ml de L-Phénylalanine déshydrogénase de concentration en protéine égale à  $0,03 \text{ mg. ml}^{-1}$ , l'activité, dosée sur  $15 \mu\text{l}$ , donne une variation d'absorbance à 600 nm de 0,040 par minute.

1°) Calculer la quantité totale de protéines et l'activité enzymatique de la L-Phénylalanine déshydrogénase:

a) dans la fraction déposée sur la colonne (14 ml)

b) dans la fraction récupérée après élution (13 ml)

2°) Calculer l'activité spécifique avant et après chromatographie, en déduire un facteur d'enrichissement en L-Phénylalanine déshydrogénase qui est le "facteur de purification".

Purification des protéines

modèle M57