

**Université Louis Pasteur de Strasbourg**  
**Faculté de Chimie**  
**Master de Chimie Verte**  
**Année 2007-2008**

**BIOCONVERSION**

24 Janvier 2008- (durée : 1 + 1 heures, P. Chaignon)

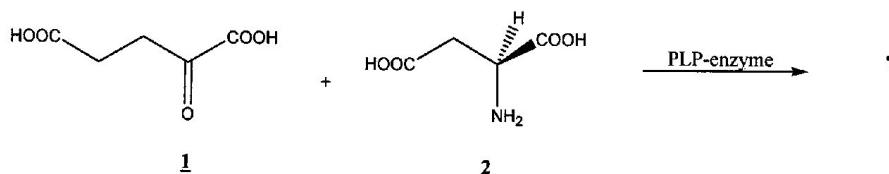
**QUESTIONS:**

Que représente la constante  $K_M$  ?

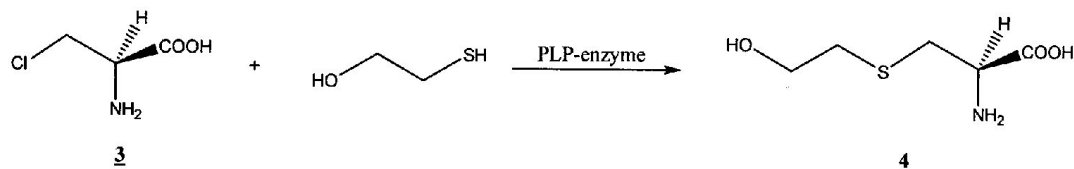
**EXERCICE 1 :**

La L-aspartate aminotransférase est une enzyme à phosphate de pyridoxal (PLP-enzyme) qui catalyse, en présence de 2-oxo-glutarate **1** et d'acide L-aspartique **2**, une réaction de transamination.

a) Représentez les deux produits obtenus sans donner le mécanisme.

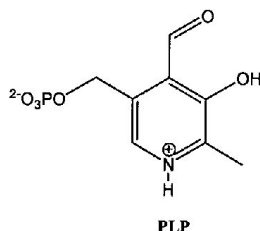


En présence de mercaptoéthanol, la L-aspartate aminotransférase catalyse la transformation de la  $\beta$ -chloroalanine **3** en S-(2-hydroxyéthyl)-cystéine **4** :



- b) Comment qualifieriez-vous les deux hydrogènes du carbone  $\beta$  des composés **1** et **2** ?  
 c) Au niveau du carbone  $\beta$ , la réaction de substitution a lieu avec rétention de configuration. Quel substrat pourriez-vous utiliser pour démontrer ceci (expliquer brièvement.) ?  
 d) Proposez un mécanisme pour cette transformation qui tient compte des aspects stéréochimiques.

**Rappel :**



### **EXERCICE 2 :**

Une enzyme, de masse moléculaire 70000 et de point isoélectrique de 9,6, présente dans le cerveau de rat, est purifiée en deux étapes de chromatographie, à partir d'un extrait brut de 25 g de protéines. Cet extrait présente une activité enzymatique spécifique de 400 UE / g de protéines.

- **Etape 1 :** La première étape consiste en une chromatographie d'exclusion sur colonne : les 25 g de protéines sont repris dans un tampon à pH 7,4 puis déposés sur la colonne à un temps zéro. A partir de ce moment, on recueille en sortie de colonne des fractions éluées de 5 ml dans lesquelles on dose l'activité enzymatique. Le résultat des dosages est donné ci-dessous, ainsi que la concentration protéique de chaque fraction :

n° de la fraction :	AE (UE/ml) :	concentration protéique (mg/ml) :
1	4	420
2	37	540
3	328	480
4	1256	570
5	216	420
6	23	280
7	2	250

AE : activité enzymatique. UE : nombre d'unités enzymatiques.

Les trois fractions contenant majoritairement l'enzyme d'intérêt sont recueillies et mélangées.

- **Etape 2 :** Le mélange des trois fractions (pH 7,4) est déposé sur une colonne contenant une résine échangeuse d'ions, qui va permettre la deuxième étape de purification de l'enzyme. Au cours de l'élution, des fractions de 5 ml sont récoltées et l'activité enzymatique est dosée dans chacune de ces fractions (voir tableau ci-après).

n° de la fraction :	AE (UE/ml) :
1	1
2	3
3	2
4	2
5	8
6	982
7	12

La fraction n° 6 est récupérée et la densité optique à 260 nm est mesurée sur cette fraction :  $DO_{260\text{ nm}} = 0,740$ . La valeur du coefficient d'extinction molaire pour l'enzyme est :  $\epsilon = 115\text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . La longueur de la cuve est 1 cm. (On considérera pour les calculs que l'enzyme est pure.)

- a) A l'issue de la chromatographie d'exclusion (étape 1), quelles sont les trois fractions que l'on mélange ? Calculez le nombre total d'UE recueilli, ainsi que la quantité totale de protéines. Quel est le volume d'élution de l'enzyme ?
- b) Quel est le type d'ion que peut échanger la résine de l'étape 2 ? Justifiez la réponse.

c) A quel pH va être réalisée l'élution pour la chromatographie échangeuse d'ions ? Justifiez la réponse. Quel est le volume d'élution de l'enzyme ?

*Pour répondre aux questions d et e, remplissez le tableau ci-dessous.*

d) Déterminez le rendement de chacune des 2 étapes de purification, ainsi que le rendement global.

e) Calculez la quantité de protéines récupérée après l'étape 2 (chromatographie d'échange d'ions). Quel est le taux de purification de l'enzyme à l'issue de chaque étape chromatographique ? Calculez le rendement, l'activité spécifique et le taux de purification global ? Conclusion ?

	protéines (g)	AE (UE)	rendement	Activité spécifique	Taux de purification
extrait	25	10000	/	400	/
étape 1					
étape 2					