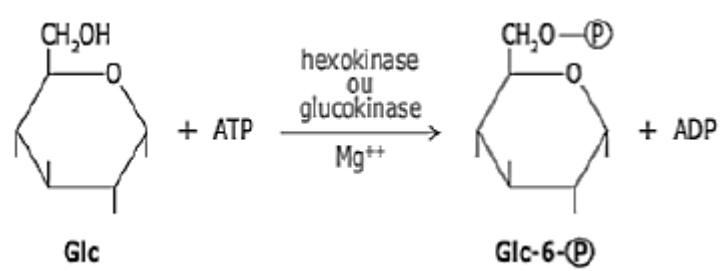
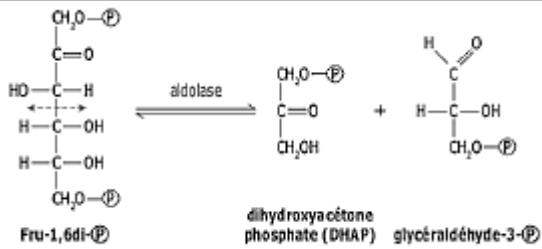
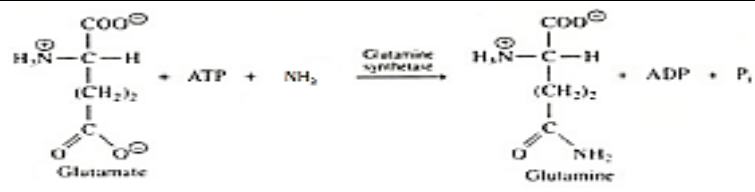
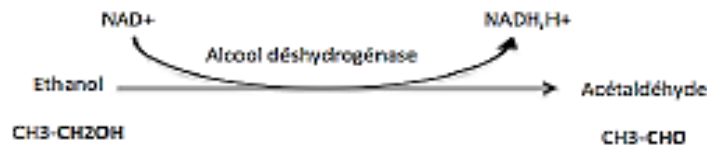


Université Mustapha Ben Boulaid Batna-2
 Faculté : SNV
 Département : Microbiologie/Biochimie
 Spécialité : Microbiologie (L3)
 TD1 d'enzymologie

Exercice 01 : Complétez le tableau suivant présentant la nomenclature EC basée sur la spécificité d'action des enzymes.

	Exemple	Spécificité d'action	Classe de l'enzyme
01	 <p> <chem>C1OC(O)C(O)C(O)C1O</chem> + ATP $\xrightarrow[\text{Mg}^{++}]{\text{hexokinase ou glucokinase}}$ <chem>C1OC(O)C(O)C(O)C1OP(=O)([O-])[O-]</chem> + ADP Glc Glc-6-(P) </p>	Transférase Car l'enzyme transfère le phosphore de l'ATP sur le glucose	02
02	 <p> <chem>C1OC(O)C(O)C(O)C1OP(=O)([O-])[O-]</chem> $\xrightarrow{\text{aldolase}}$ <chem>C1OC(O)C1OP(=O)([O-])[O-]</chem> + <chem>C1OC(O)C(O)C1OP(=O)([O-])[O-]</chem> Fru-1,6di-(P) dihydroxyacétone phosphate (DHAP) glycéraldéhyde-3-(P) </p>	Lyase Est une réaction lytique de dégradation d'une liaison covalente entre C3 et C4 en fru-1,6 diP Non hydrolytique (sans introduction de l'eau) Non oxydante (sans oxydo-réduction)	04
03	 <p> <chem>C(CC(=O)[O-])[C@@H](N)C(=O)[O-]</chem> + ATP + NH₃ $\xrightarrow{\text{Glutamine synthetase}}$ <chem>C(CC(=O)N)[C@@H](N)C(=O)[O-]</chem> + ADP + P_i Glutamate Glutamine </p>	Ligase Est une réaction de condensation entre glutamate et NH ₃ par une liaison covalente avec consommation d'énergie sous forme d'ATP.	06
04	 <p> <chem>CCO</chem> $\xrightarrow{\text{Alcool déshydrogénase}}$ <chem>CC=O</chem> Ethanol Acétaldéhyde CH₃-CH₂OH CH₃-CHO </p> <p style="text-align: center;"> NAD⁺ $\xrightarrow{\hspace{10em}}$ NADH, H⁺ </p>	Réaction d'oxydoréductase Où il y a le transfert des électrons accompagné par les protons H par	01



Pour déterminer le degré et le rendement de purification de l'enzyme on aura besoin de calculer l'activité spécifique selon la formule suivante :

Activité spécifique = UI ($\mu\text{mole}/\text{min}$) / quantité de protéine en mg.

Activité spécifique de l'enzyme dans l'homogénat = $5000/200$
= **25 UI/mg protéine ou**

$\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protéine

Activité spécifique de l'enzyme purifiée = $500/4$
= **125 UI/mg protéine ou**

$\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ protéine

Rendement = $\frac{\text{activité enzymatique de l'extrait obtenu(enzyme purifiée en UI)}}{\text{activité enzymatique de l'extrait initial(homogénat en UI)}} \times 100 =$

Rendement = $\frac{500}{5000} \times 100$

= **0.1 X100**

= **10%**

Degré de purification = $\frac{\text{activité spécifique enzymatique de l'extrait obtenu(enzyme purifiée en } \frac{\text{UI}}{\text{mg protéine}} \text{)}}{\text{activité spécifique enzymatique de l'extrait initial(homogénat } \frac{\text{UI}}{\text{mg protéine}} \text{)}}$

Degré de purification de l'enzyme dans l'homogénat = $\frac{25}{25}$

= **1 fois**

Degré de purification de l'enzyme = $\frac{125}{25}$

= 5 fois par apport à l'homogénat

Le rapport qui peut être déduit de ce résultat est le suivant : plus que l'activité spécifique augmente plus que l'indice de purification augmente (proportionnels)

Exercice 04 :

L'activité d'une enzyme est testée après deux étapes de purification successives :

- étape 1 : 1,2 g de protéine sont récupérés dans 50 ml (extrait 1).

- étape 2 : 0,36 g de protéine sont récupérés dans 12 ml (extrait 2).

La dilution de 20 μl de chaque extrait dans 1 ml de milieu réactionnel se traduit par la formation de 1,6 micromole (extrait 1) et 5,9 micromoles (extrait 2) de produit par minute.

Quel est le rendement et l'indice de la purification de l'enzyme au cours de la purification ?

Solution/exercice04 :



1)- En premier lieu on doit calculer le nombre d'unités et l'activité spécifique enzymatique **avant la purification** (dans l'extrait 01 – première étape)

A) Nombre d'unité ou activité enzymatique avant la purification (extrait 01):

Dans un millilitre (01 ml ou 1000 µl)

$$20 \mu\text{l} \longrightarrow 1.6 \text{ U}$$

$$1000 \mu\text{l}(1 \text{ ml}) \longrightarrow x$$

$$X = 1.6 \times 1000 / 20$$

$$= 80 \text{ U}$$

Donc 01 ml contenant 80 U ou 80 µ mole/min

- On calcule le nombre d'unités dans 50 ml. Comme suit :

$$80 \text{ U} \longrightarrow 1 \text{ ml}$$

$$X \text{ U} \longrightarrow 50 \text{ ml}$$

$$X = 80 \times 50$$

$$= 4000 \text{ U ou } 4000 \mu \text{ mole/min.}$$

B) Activité spécifique enzymatique avant la purification

L'activité spécifique(AS) est calculée selon la formule suivante :

On a 1.2 g de protéine = 1200 mg dans l'extrait 01

$$\text{Activité enzymatique} = 4000 \text{ UI ou } 4000 \mu \text{ mole/min}$$

$$\text{Donc : AS} = \frac{\text{UI}}{\text{mg protéine}} = \frac{4000}{1200} = 3.33 \mu \text{ mole/min/ mg}$$

2)- De la même façon on calcule l'activité enzymatique en UI et l'activité spécifique enzymatique (AS) en µ mole /min/mg protéine après la purification (dans l'extrait 02).

A)-Nombre d'unité ou activité enzymatique après la purification (extrait 02):

-Dans un millilitre (01 ml ou 1000 µl)

$$20 \mu\text{l} \longrightarrow 5.9 \text{ U}$$

$$1000 \mu\text{l}(1 \text{ ml}) \longrightarrow x$$

$$X = \frac{5.9 \times 1000}{20} = 295 \text{ UI ou } 295 \mu \text{ mole/min}$$

Nombre d'unité ou activité enzymatique dans 12 ml.

$$295 \text{ U} \longrightarrow 01 \text{ ml}$$

$$X \longrightarrow 12 \text{ ml}$$

$$X = \frac{295 \times 12}{01} = 3540 \text{ UI ou } 3540 \mu \text{ mole/min}$$



B)-Activité spécifique (AS) après la purification (dans l'extrait 02).

On a 0.36 g de protéine= 360 mg

Nombre d'unité = 3540

$$\text{Donc :AS} = \frac{3540}{360} = \mathbf{9.83 \text{ UI/mg ou } \mu\text{mole /min/ mg}}$$

Après avoir calculé L'activité enzymatique et l'activité spécifique dans les deux extraits (1 et 02), on va calculer le rendement et l'indice de purification dans l'extrait 01 après la purification (consulter le tableau de purification chapitre 03) selon les formules suivantes :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{activité enzymatique de l'extrait obtenu (UI)}}{\text{activité enzymatique de l'extrait initial (UI)}} \times 100$$

Extrait obtenu= extrait 02 , après purification dont l'activité enzymatique = **3540 UI**.

Extrait initial = extrait 01 ,avant la purification dont l'activité enzymatique = **4000 UI**

$$\text{Donc le rendement} = \frac{3540}{4000} \times 100 = \mathbf{88.5\%}$$
 par apport à l'extrait initial

$$\text{L'indice de purification} = \frac{\text{activité spécifique de l'extrait obtenu} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}}\right)}{\text{activité spécifique de l'extrait initial} \left(\frac{\text{UI}}{\text{mg}}\right)}$$

-Activité spécifique de l'extrait obtenu = **9.83 UI/mg ou μ mole/min/mg.**

-Activité spécifique de l'extrait initial = $\frac{9.83}{3.33} = \mathbf{2.95 \approx 3 \text{ fois}}$ par apport à l'extrait initial.

NB : rendement de l'extrait 01 = **100%**

Indice de purification de l'extrait 01 = **1 fois**