



Département des Classes Préparatoire

Polycopie Pédagogique

Recueil de travaux pratiques

Biochimie

2ème année des Classes Préparatoires

Dr. Ali BOUKADOUM

Maitre de Conférence 'B'

Matière enseignée pendant les années universitaires :

2016/2017

2017/2018

2018/2019

2019/2020

2020/2021

Année universitaire 2022/2023

Table des matières	Page 1
Avant-propos	Page 2
Travaux pratiques	Page 3
TP 1 : Dosage par spectrophotométrie (UV-Visible)	Page 3
TP 2 : Caractérisation et dosage volumétrique des glucides (liqueur de fehling)	Page 7
TP 3 : Dosage des glucides par polarimétrie (mise en évidence du pouvoir rotatoire des oses)	Page 12
TP 4 : Les lipides (détermination de l'indice de saponification et d'acidité)	Page 16
TP5 : Caractérisation des acides aminés et des protéines	Page 20
TP6 : Dosage des protéines totales d'un échantillon	Page 24
Notions	Page 28
Références bibliographiques	Page 32

Avant-propos

Un **organisme vivant** fonctionne en réalisant un ensemble de réactions chimiques intégrées qui constituent son **métabolisme**. Ainsi, plus d'un millier de réactions chimiques s'effectuent dans un organisme aussi simple que la bactérie *Escherichia coli*.

Les réactions métaboliques sont classées en deux grandes catégories, les réactions **cataboliques** qui correspondent aux réactions de **dégradation** permettant de convertir l'énergie de molécules source d'énergie en des formes biologiquement utilisables, et les réactions **anaboliques** qui regroupent les réactions de **synthèse** nécessitant un apport d'énergie pour pouvoir s'effectuer.

Dans les propriétés **physicochimiques** de ces différents constituants de la **matière vivante**, j'ai essayé de donner et d'insister sur la finalité de l'existence de telles réactions dans l'organisme et leurs utilisation à des fins analytiques.

Travaux Pratiques : BIOCHIMIE

TP 1 : Dosage par spectrophotométrie (UV-Visible).

Introduction

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très commune dans les laboratoires. Principalement quantitative, elle consiste à mesurer l'absorbance (A) ou la densité optique (DO) d'une solution à une longueur d'onde (λ) donnée (procédé appelé dosage colorimétrique). Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des substances en solution.

Principe

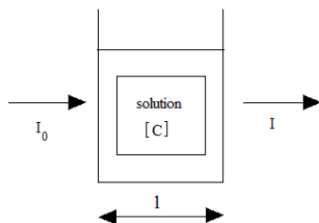
Lorsqu'un faisceau d'intensité I_0 traverse une solution de molécules absorbantes, le faisceau transmet (émergent) présente une intensité I inférieure à I_0 . Il y a eu absorption énergétique (photons) par les molécules en solutions. Ce phénomène d'absorption est évalué par le rapport :

La transmittance $T = I/I_0$ (exprimée en %)

Ou le plus souvent par

$$\text{Log}(T) = \log(I/I_0) = \text{Absorbance (A)}$$

L'absorbance (A) n'a pas d'unité.



Loi de Beer-Lambert

L'absorbance A d'une espèce colorée en solution suit la loi de Beer-Lambert;

$$A (Do) = \epsilon L C$$

ϵ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) : coefficient d'extinction (absorption) molaire à la longueur d'onde.

L (cm) : longueur du chemin optique (Épaisseur de solution traversée).

C ($mol \cdot L^{-1}$): concentration molaire (concentration de la molécule absorbante).

Objectifs

- Déterminer la longueur d'onde appropriée à notre solution.
- Effectuer un dosage spectrophotométrique à partir d'une gamme étalon.

Matériels et produits requis

Spectrophotomètre, cuves en plastique, solution de bleu de méthylène (10^{-5} mol/l), eau distillée, pipettes de 10ml, micropipettes, tubes de 15 ml et portoirs à tubes.

Protocole expérimental

Détermination de la longueur d'onde maximum d'absorption :

- Réaliser un balayage à l'aide d'une solution de bleu de méthylène à la concentration suivante : 1.10^{-5} mol/l entre les longueurs d'onde 500-700nm pour déterminer le max d'absorption (avancer avec un intervalle de 50nm).
- Tracer la courbe $A=F(\lambda)$ à partir des points obtenus lors de la lecture
- Déterminer la valeur de λ_{\max} de l'absorbance A maximale

Réalisation et utilisation d'une gamme étalon

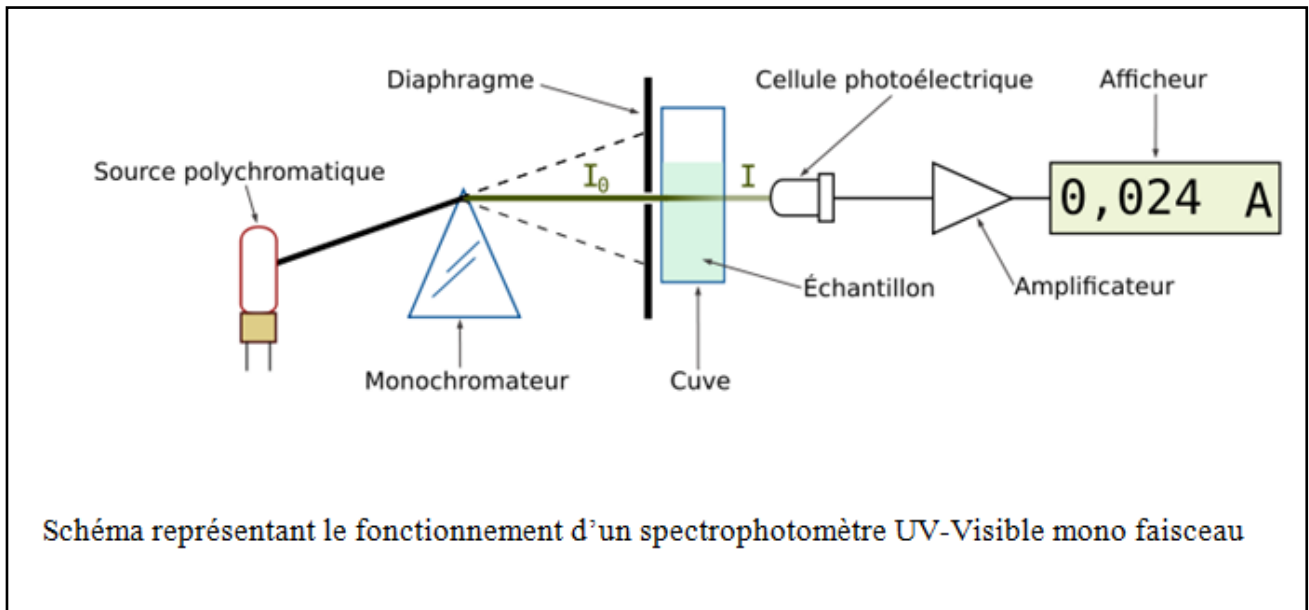
- Préparer quatre dilutions à partir de la solution mère du bleu de méthylène (8.10^{-6} mol/l, 6.10^{-6} mol/l, 4.10^{-6} mol/l, 2.10^{-6} mol/l) pour un volume final de 10ml.
- Remplir les cuves avec les différentes dilutions de bleu de méthylène
- Utiliser l'eau distillée comme blanc pour l'étalonnage
- Régler le spectrophotomètre sur la longueur d'onde où l'absorbance est maximale **(Voir résultat partie 1)**.
- Lire les absorbances A.
- Tracer la droite d'étalonnage : $A=F(C)$. Le A représente l'absorbance et C représente la concentration de la solution (mol/l).
- Déterminer à l'aide du graphe, la concentration inconnue en bleu de méthylène (mol/l) d'une solution X

Important à savoir

- Réglages des spectrophotomètres ; Il faut régler le zéro de DO en mode absorbance avec le tube témoin en place dans le porte-cuve, régler la valeur affichée à 0. Ce réglage doit être effectué à chaque changement de la longueur d'onde de travail.
- Les dosages colorimétriques s'appuient sur la loi de Beer Lambert qui indique que la densité optique (DO) ou absorbance d'un produit en solution est proportionnelle à sa concentration.
- La gamme d'étalonnage permet de réaliser un graphe où les DO sont exprimées en fonction de la quantité (et non de la concentration) de produit par tube de gamme (en mg, µg, µmol ... selon le cas).
- Les étapes de calculs sont les suivantes :
 - 1- mesurer des DO des tubes « inconnus »
 - 2- déterminer les quantités de produit à doser contenues dans ces tubes.
 - 3- calculer la concentration correspondante du produit dans 1ml de la solution inconnue contenue dans ces tubes.
 - 4- Faire la moyenne des résultats obtenus pour un échantillon donné. Attention : vous ne pouvez faire la moyenne que si les résultats obtenus sont proches (moins de 20% d'écart environ). Si les résultats divergent trop, il faut les traiter séparément jusqu'au résultat final. On aura dans ce cas deux valeurs de concentrations pour un échantillon.
 - 5- Appliquer le cas échéant le facteur de dilution.
 - 6- Exprimer le résultat final en utilisant l'unité demandée.
- Utilisation des micropipettes automatiques
 - a) Régler le volume à prélever.
 - b) Placer un cône jaune sur l'embout de la pipette.
Eviter de toucher le cône avec les doigts.
 - c) Enfoncer le piston jusqu'à la résistance.
(Pour acquérir une bonne notion de l'utilisation de ces micropipettes, essayer, à vide, d'enfoncer le piston jusqu'à la résistance puis, en appuyant plus fort, dépasser cette résistance).
 - d) Introduire le cône dans la solution à prélever et relâcher le piston.
 - e) Enfin pour délivrer le volume prélevé, enfoncer à fond le piston.

Il est évident que, pour une très grande part, le résultat final dépendra de la précision des pipetages.

Schéma général du fonctionnement d'un spectrophotomètre.



Travaux Pratiques : BIOCHIMIE

TP 2 : Caractérisation et dosage volumétrique des glucides (liqueur de fehling).

1. Principe de la méthode de Bertrand

Le glucose réduit partiellement la liqueur de Fehling en excès, l'oxyde cuivreux formé (précipité rouge) est dosé par manganimétrie. Une table donne la correspondance entre la masse de cuivre et la masse de glucose. La réaction doit se dérouler à chaud et pendant trois minutes à partir de l'ébullition pour respecter la correspondance des tables. Une quantité de glucose réagit avec les ions cuivre(II) en excès pour former un précipité rouge brique. L'excès d'ions cuivre(II) est éliminé. Le précipité réagit avec un excès d'ions fer(III) pour le dissoudre. On obtient des ions fer(II) dosés par une solution de permanganate de potassium.

Objectifs :

Dans le cadre de ce TP nous nous limiterons à la caractérisation et dosage volumétrique des glucides (liqueur de Fehling).

Dosage volumétrique : Doser signifie **rechercher la quantité de matière d'une espèce chimique en solution (réactif titré)** en la faisant **réagir avec une espèce chimique en solution de concentration exactement connue (réactif titrant)**.

2. Protocole expérimental

1. Préparation des solutions et de la Liqueur de Fehling

1.1. Solution A

- Dans un erlenmeyer de 250 mL :
- Dissoudre 7g de sulfate de cuivre pentahydraté ($M = 250 \text{ g / mol}$; $n = 28 \text{ mmol}$) dans 100 mL d'eau

1.2. Solution B

- Dans un erlenmeyer de 250 mL :
- Dissoudre 34,6 g de tartrate double de sodium et de potassium ($M = 210 \text{ g / mol}$; $n = 165 \text{ mmol}$)
- 10 g d'hydroxyde de sodium ($M = 40 \text{ g / mol}$; $n = 250 \text{ mmol}$) dans 100 mL d'eau

1.3. Solution de glucose

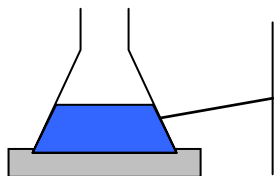
- Dans un erlenmeyer de 250 mL :
- Dissoudre 1 g de glucose dans 100 mL d'eau

1.4. Solution de saccharose

- Dans un erlenmeyer de 250 mL :
- Dissoudre 1 sucre dans 100 mL d'eau

2. Réduction de la solution cuivrique (Cu^{2+}) par la solution de glucose

Dans une fiole Erlenmeyer de 250 mL propre placer :

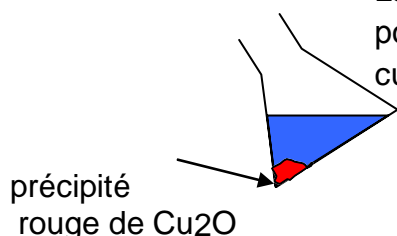


- 20 mL de la solution cuivrique : liqueur de Fehling A.
- 20 mL de la solution tartré-sodique : liqueur de Fehling B.
- 10 mL de la solution de glucose à doser.
- 10 mL d'eau distillée.

- Chauffer jusqu'à ébullition et maintenir une ébullition douce pendant 3 minutes.

Remarque : Dès que cette étape est finie, chauffer de l'eau distillée (environ 300 mL)

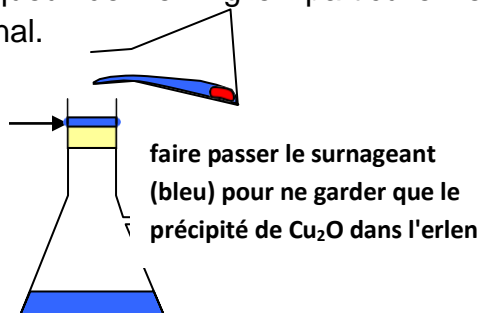
Laisser refroidir le mélange en maintenant la fiole inclinée pour décanter (déposer) le précipité rouge d'oxyde de cuivre.



a) Lavage du précipité d'oxyde de cuivre

Le précipité de Cu_2O est isolé par filtration et est lavé pour éliminer tout excès de liqueur de Fehling en particulier le tartrate qui fausse le dosage manganimétrique final.

ne jamais
laisser à l'air
(sec)



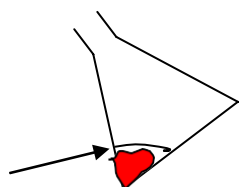
- Adapter le papier filtre sur un entonnoir sur une fiole.

- Verser le surnageant sur le filtre. Prendre soin d'entraîner le moins de précipité possible et de ne jamais le laisser en contact avec l'air en le maintenant toujours recouvert d'une couche de liquide (Erlen incliné).

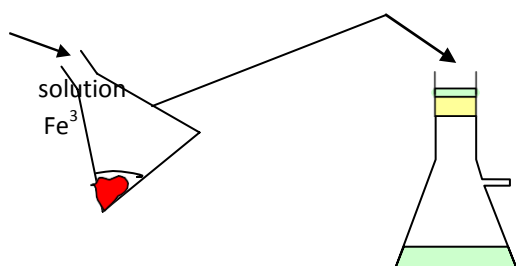
- Verser environ 20 mL d'eau distillée bouillante dans la fiole d'Erlenmeyer, l'agiter pour laver le précipité et laisser décanter le précipité, fiole inclinée.

- Recommencer l'opération 3 fois jusqu'à la disparition de la couleur bleue et ce afin d'éliminer toute trace de tartrate.

minimum
d' H_2O
possible



b) Oxydation du précipité de Cu_2O par une solution ferrique (Fe^{3+})



La réaction d'oxydo-réduction (oxydant : Fe^{3+} ; réducteur : Cu_2O) se fait à froid

- Verser 20 mL de solution ferrique (10 mL $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ à 0.02M + 10 mL de H_2SO_4 à 1N) sur le précipité (resté dans la fiole d'Erlenmeyer) puis agiter la fiole erlenmeyer jusqu'à complète dissolution du précipité. La solution devient verte (présence de fer II).

c) Dosage du fer ferreux formé (Fe^{2+}) par manganimétrie

La réaction d'oxydo-réduction (oxydant : MnO_4^- ; réducteur : Fe^{2+}) se fait à froid en milieu acide. Le virage : de vert pâle au gris puis rose.

- Effectuer le dosage des ions fer II formés, directement dans la fiole à l'aide de la solution de permanganate de potassium étalonnée (0.02mol/l).
- Verser le permanganate jusqu'à coloration rose persistant 30 secondes.
- Noter le volume équivalent.

3. Résultats

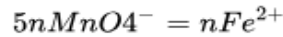
A l'aide de la table de Bertrand la masse du glucose contenu dans l'échantillon sera déduite à partir du volume de KMnO_4 et le calcul de la masse de cuivre en mg ayant réagit.

Equations de réactions

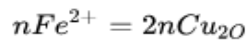
- oxydation du glucose
 - $2\text{Cu}^{2+} + 2\text{OH}^- + 2e^- \longrightarrow \text{Cu}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$
 - glucose \longrightarrow produits d'oxydation + n e^-
- oxydation du Cu_2O par les ions Fe^{3+}
 - $\text{Cu}_2\text{O} + 2\text{H}^+ \longrightarrow 2\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O} + 2e^-$
 - $(\text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + e^-) \times 2$
 - $\text{Cu}_2\text{O} + 2\text{Fe}^{3+} + 2\text{H}^+ \longrightarrow 2\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{Fe}^{2+}$
- Dosage de Fe^{2+} par une solution de permanganate titrée
 - $[\text{Fe}^{2+} \longrightarrow \text{Fe}^{3+} + e^-] \times 5$
 - $\text{MnO}_4^- + 8\text{H}^+ + 5e^- \longrightarrow \text{Mn}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O}$
 - $5\text{Fe}^{2+} + \text{MnO}_4^- + 8\text{H}^+ \longrightarrow 5\text{Fe}^{3+} + \text{Mn}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O}$

Relation pour le calcul

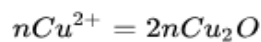
1 mole de MnO_4^- réagissent avec 5 moles de Fe^{2+}



2 moles de Fe^{2+} proviennent de 1 mole de Cu_2O



1 mole de Cu_2O proviennent de 2 moles de Cu^{2+}



donc $nCu^{2+} = nFe^{2+} = 5nMnO_4^-$

$$mCu = 5 \times V_{MnO_4^-} \times C_{MnO_4^-} \times M_{molaire}(Cu)$$

Une fois la masse de cuivre connue, il nous faut utiliser les tables de Bertrand, qui donnent la relation entre la concentration de glucose et celle de précipité de cuivre formé.

Utilisation des tables de Bertrand

Il n'y a pas de proportionnalité entre les masses de cuivre formé et le glucose On ne peut donc pas utiliser le produit en croix, mais néanmoins une Interpolation Linéaire est envisageable.

sucre en mg	cuivre en mg
10 A	20,6 D
x B	22,0 E
11 C	22,6 F

$$\frac{B-A}{C-A} = \frac{E-D}{F-D}$$

$$\frac{x-10}{11-10} = \frac{22-20,6}{22,6-20,6}$$

$$\frac{x-10}{1} = 0,7$$

$$x-10 = 0,7$$

$$x = 10 + 0,7$$

$$x = 10,7 \text{ mg de glucose}$$

Table de conversion glucose en mg

glucose en mg	cuivre en mg	glucose en mg	cuivre en mg	glucose en mg	cuivre en mg
10	20,4	40	77,5	70	129,8
11	22,4	41	79,3	71	131,4
12	24,3	42	81,1	72	133,1
13	26,3	43	82,9	73	134,7
14	28,3	44	84,7	74	136,3
15	30,2	45	86,4	75	137,9
16	32,2	46	88,2	76	139,6
17	34,2	47	90,0	77	141,2
18	36,2	48	91,8	78	142,8
19	38,1	49	93,6	79	144,5
20	40,1	50	95,4	80	146,1
21	42,0	51	97,1	81	147,7
22	43,9	52	98,9	82	149,3
23	45,8	53	100,6	83	150,9
24	47,7	54	102,3	84	152,5
25	49,6	55	104,1	85	154,0
26	51,5	56	105,8	86	155,6
27	53,4	57	107,6	87	157,2
28	55,5	58	109,3	88	158,8
29	57,2	59	111,1	89	160,4
30	59,1	60	112,8	90	162,0
31	60,9	61	114,5	91	163,6
32	62,8	62	116,2	92	165,2
33	64,6	63	117,9	93	166,7
34	66,5	64	119,6	94	168,3
35	68,3	65	121,3	95	169,9
36	70,1	66	123,0	96	171,5
37	72,0	67	124,7	97	173,1
38	73,8	68	126,4	98	174,6
39	75,7	69	128,1	99	176,2
				100	177,8

Travaux Pratiques : BIOCHIMIE

TP 3 : Dosage des glucides par polarimétrie (mise en évidence du pouvoir rotatoire des oses).

Introduction :

Lorsqu'une solution contenant une molécule présentant une asymétrie est traversée par un faisceau de lumière polarisée, le plan de polarisation de la lumière est dévié, vers la gauche [molécule lévogyre (-)] ou vers la droite [molécule dextrogyre (+)]. La dissymétrie de la molécule est due habituellement à la présence d'un (ou plusieurs) carbones substitués asymétriquement, les deux isomères (inverses optiques ou énantiomères) ont les mêmes propriétés physiques (densités, indice de réfraction, température de fusion, ...) et ne diffèrent que par leurs pouvoirs rotatoires qui sont opposés. Dans le cas d'une substance optiquement active en solution dans un solvant inactif, la rotation produite est exprimée par la loi de Biot :

$$\left[\alpha = [\alpha]_{D}^{20^{\circ}C} \cdot l \cdot \rho \right]$$

- α est en degrés, l est en dm, ρ est en g.mL⁻¹. (en système SI α en degrés, l en m et ρ en kg.m⁻³).
- $[\alpha]_{D}^{20^{\circ}C}$: est le pouvoir rotatoire spécifique de la substance active dissoute. Il dépend peu de la température¹ mais est fonction de la longueur d'onde de la lumière utilisée.
- On donne en général la valeur du pouvoir rotatoire spécifique pour la raie D du sodium ($\lambda_1 = 589,0$ et $\lambda_2 = 589,6$ nm). Il s'exprime en °.dm⁻¹.g⁻¹.mL (°.m².kg⁻¹ en SI), mais en pratique on utilise souvent tout simplement le degré.
- La loi de Biot est une loi additive : le pouvoir rotatoire d'un mélange est la somme algébrique des pouvoirs rotatoires de chacune des substances.

- Les glucides possèdent un ou plusieurs centres de dissymétrie (ou centre de chiralité) : ils sont donc optiquement actifs et sont dosables par polarimétrie.




Le protocole :

A partir de la solution étalon (saccharose) à 500g/L, préparer en fiole de 20 ml cinq solutions à : 0.05 g/ml, 0.1 g/ml, 0.2 g/ml, 0.3 g/ml, 0.4 g/ml

Concentration massique (mg/ml)	0	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	X
Volume de la solution mère à prélever (ml)	0						
Volume d'eau (ml)	20						
α lu							

Réglage de l'appareil au zéro :

Allumer la lampe au sodium du polarimètre au moins 10 min avant d'effectuer les mesures. Mettre en place dans l'appareil le tube polarimétrique rempli d'eau distillée (veiller à ne pas laisser de bulle d'air). A l'aide de l'oculaire mettre au point sur le bord de lame demi-onde. Se placer dans les conditions optimales d'éclairage en réglant l'angle de pénombre. Réaliser l'égalité d'éclairage des plages, puis appuyer sur zéro.

	plage droite plus claire	faire tourner vers la droite
	plage gauche plus claire	faire tourner vers la gauche
	équipénombre	Relever la valeur de l'angle

- Pour chaque solution fille préparée, remplir le tube polarimétrique avec la solution à analyser (les solutions filles), l'équipénombre n'est plus réalisée. Faire tourner pour revenir à l'équipénombre (égalité d'éclairement des plages).
- Lire l'angle α
- Rincer soigneusement le tube et essuyer la gouttière après utilisation.

Résultats :

- Tracer la droite d'étalonnage $\alpha = f(P \text{ en g/ml})$, commenter la courbe.
- Déterminer $[\alpha]$ pour le composé étudié à la T du laboratoire et comparer à la valeur théorique $+ 66.5 \text{ degré} \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{ml}$
- Déterminer graphiquement la concentration de la solution X.

Pouvoir rotatoire spécifique à 20 °C et à 589 nm :

saccharose = $+ 66,5 \text{ }^\circ \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{mL}$. glucose = $+ 52,5 \text{ }^\circ \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{mL}$.

fructose = $- 92,4 \text{ }^\circ \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{mL}$. galactose = $+ 80,2 \text{ }^\circ \cdot \text{dm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{mL}$.

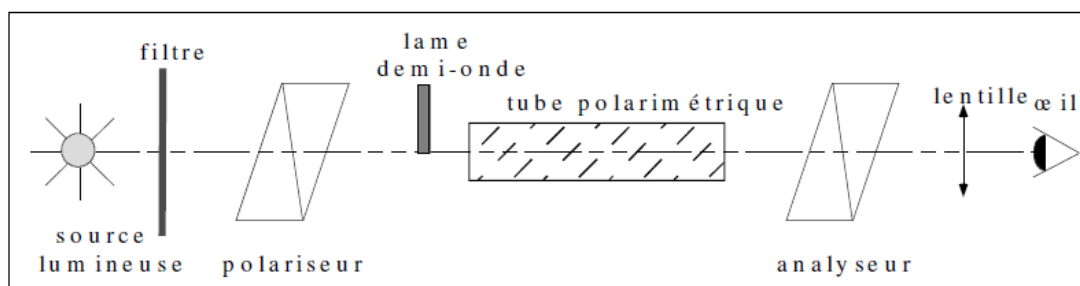


Schéma d'un polarimètre

Le polarimètre de Laurent est constitué de :

- une source lumineuse (lampe à vapeur de sodium)
- un filtre ($\lambda = 589 \text{ nm}$)
- un polariseur qui polarise la lumière qu'il reçoit.

- une lame demi-onde couvrant la moitié du faisceau qui transforme la vibration reçue en sa symétrique par rapport à une ligne neutre verticale.
- un tube contenant le solvant ou la solution dont on veut mesurer le pouvoir rotatoire
- un analyseur qui peut tourner autour de l'axe de l'appareil avec un système permettant de mesurer l'angle de rotation avec précision
- un oculaire permet de mettre au point dans le plan de la lame demi-onde.

Remarques :

Une solution de α -D-glucopyranose est dextrogyre $[\alpha] = + 113^\circ$. Au bout de quelques heures, son pouvoir rotatoire diminue et atteint $+ 52,5^\circ$ par suite de la mutarotation : β -D-glucopyranose \leftrightarrow α -D-glucopyranose. A l'équilibre on a 36 % de glucose α et 64 % de glucose β . Pour le β -D-glucopyranose le pouvoir rotatoire spécifique est $[\alpha] = + 19^\circ$

Si α est positif alors la solution est **DEXTROGYRE**. Si α est négatif alors la solution est **LEVOGYRE**.

Travaux Pratiques : BIOCHIMIE

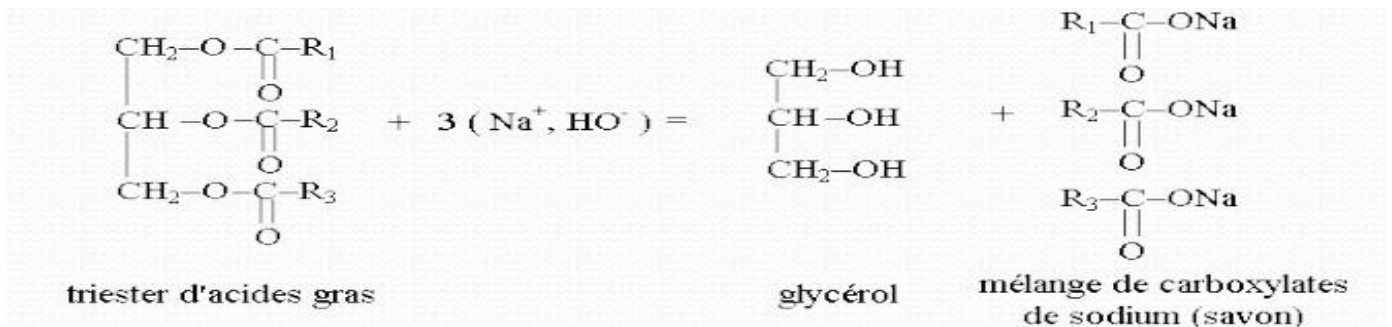
TP 4 : Les lipides (détermination de l'indice de saponification et d'acidité).

I Saponification

Principe

Les corps gras utilisés pour créer un savon sont les triglycérides qui sont des triesters.

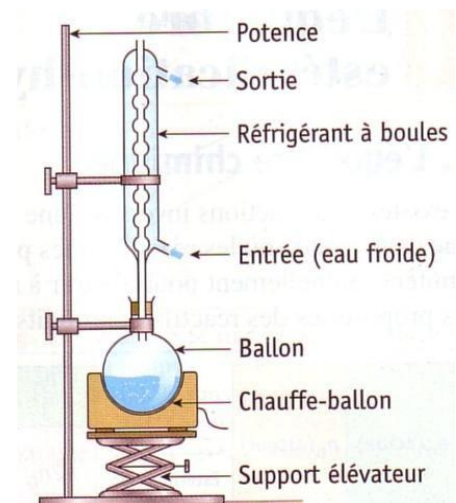
L'équation de la réaction s'écrit :



La saponification est une réaction totale mais lente qui peut être accélérée grâce à une température élevée par un chauffage du milieu réactionnel à l'aide d'un **montage à reflux**.

La circulation d'eau dans le réfrigérant à boule, permet de refroidir les vapeurs formées lors du chauffage, provoquant leur liquéfaction. Le liquide résultant retombe dans le ballon, c'est le reflux. Il n'y a donc pas de pertes de matières au cours de ce type de chauffage.

Le support élévateur permet de stopper rapidement le chauffage. En abaissant le chauffe-ballon, le ballon n'est plus à son contact et le chauffage est immédiatement stoppé.



On dépose souvent quelques grains de pierre ponce pour réguler l'ébullition, ce qui permet d'éviter d'avoir de grosses bulles qui se forment et projettent le milieu réactionnel sur les parois du ballon et du réfrigérant.

Mode opératoire

Dans un ballon verser :

- Pierre ponce (pierre volcanique extrêmement légère : régulateur d'ébullition)
- 30 ml d'échantillon (l'huile d'olive, l'huile de tournesol)
- 30 ml d'hydroxyde de sodium concentré
- 60 ml d'éthanol (solvant pour homogénéisation de l'huile avec l'hydroxyde de sodium))
- Introduire le ballon dans le dispositif à reflux : **1^{ère} étape chauffage à reflux**
- Après ébullition, laisser le mélange réagir pendant 20 min
- Dans une erlenmeyer mettre 200ml de chlorure de sodium saturé
- Après refroidissement, transvaser le mélange réactionnel du ballon dans l'erlenmeyer : **2^{ème} étape relargage**
- Précipitation du savon car il n'est pas soluble dans le chlorure de sodium saturé
- Filtrer le mélange : **3^{ème} étape filtration**
- Dans un tube à essai mettre une petite quantité du savon et ajouter l'eau distillée et bien agiter : **4^{ème} étape propriétés moussantes**

II Indice d'acidité

Principe

L'acidité est le degré ou le pourcentage d'acide gras libre exprimé conventionnellement en acide oléique (**Pardo et al., 2007**). Son principe est basé sur la mise en solution d'une quantité de matière grasse dans de l'éthanol chaud, puis titrage des acides gras libres avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ou de potassium en présence d'un indicateur coloré phénolphaléine selon la réaction suivante :



Objectif

- Calculer l'indice d'acidité de l'huile de tournesol et de l'huile d'olives.
- Comparer ces indices aux normes internationales.

Mode opératoire

- Préparer dans un erlenmeyer une solution de 75 ml d'alcool neutralisé (éthanol et quelques gouttes de phénolphthaléine neutralisé par une solution d'hydroxyde de sodium jusqu'à apparition d'une coloration rose).
- Ajouter 10g de l'huile à analyser et chauffer sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution de l'huile (pendant 15 à 20 min)
- Ajouter 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine à 1%
- Titrer en agitant avec une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1N jusqu'à l'obtention d'une couleur rose persistante quelques secondes.
- Noter le volume de NaOH versé

Expression des résultats

- L'acidité est donnée par la relation suivante : $V \times N \times M$
- **Acidité %** = $m \times 10$
- **V** : Volume d'hydroxyde de sodium utilisé pour le titrage exprimé en ml ;
- **N** : Normalité d'hydroxyde de sodium à 0,1N ;
- **M** : Masse équivalente de l'acide oléique (**282g/mol**) ;
- **m** : Masse en gramme de la prise d'essai (**10g**).

III Indice de saponification

Principe

L'indice de saponification (I_s) correspond à la quantité (en milligrammes) de potasse (KOH) nécessaire pour saponifier un gramme de matière grasse. On saponifie à chaud, en présence d'un excès de KOH une prise d'essai de corps gras. L'excès de réactif est titré par une solution d'acide chloridrique (HCl).

Objectif

- Calculer l'indice de saponification de l'huile de tournesol et de l'huile d'olives.
- Comparer ces indices aux normes internationales.

Matériels et produits requis

Erlens, burettes, éprouvettes, bain-marie, pipettes et propipettes, solution de KOH alcoolique 0,5 M, solution d'HCL à 0,5 M. Phénolphtaléine à 1%, solvant constitué d'un mélange 1 :1 éthanol 95% et d'éther diéthylique.

Protocole expérimental

- Peser 2 g de corps gras (huile de tournesol ou huile d'olives) dans un erlenmeyer.
- Ajouter 5 ml du solvant constitué d'un mélange éthanol-éther diéthylique à parts égales en volume.
- Agiter pour dissoudre le corps gras.
- Ajouter 25 ml de solution de KOH alcoolique.
- Mettre au bain-marie bouillant à 60°C pendant 30 minutes.
- Laisser refroidir et ajouter 2 ou 3 gouttes de phénolphtaléine à 1%.
- Titrer l'excès de KOH par la solution acide (HCl 0.5M) jusqu'à disparition de la coloration rose.
- Noter le volume d'HCl versé.

Préparation du témoin

Traiter dans les mêmes conditions opératoires que les essais (les mêmes étapes mais sans l'ajout de la matière grasse)

Expression des résultats

I_s : indice de saponification ;

V_T : volume versé au témoin, en ml

V_E : $(V_T - V_E) \times C_{HCl} \times M_{KOH}$

$I_s = \frac{C_{HCl} \times (V_T - V_E) \times M_{KOH}}{m}$ avec acide chlorhydrique, en mol/l.

M_{KOH} : masse molaire de KOH (56,1 g/mol).

m : masse de corps gras analysée, en g.

Travaux Pratiques : BIOCHIMIE

TP 5 : Caractérisation des acides aminés et des protéines.

Caractéristique des acides aminés

Les acides aminés (ou acides α -aminés) possèdent une fonction acide carboxylique (-COOH) et une fonction amine (-NH₂), comme son nom l'indique. Les acides aminés ont un groupement acide (donneur de H⁺) et un groupement basique (accepteur de H⁺). La fonction acide donne des sels en présence de bases, des esters par réaction avec un alcool, et peut-être transformée en chlorure d'acide pour accélérer la réaction d'estérification. La fonction amine primaire réagit avec les chlorures d'acide en donnant une amide.

1. Principe

1.1 Réactions colorées particulières à certains aminoacides

La ninhydrine (2,2-dihydroxyindan-1,3-dione) est un composé aromatique utilisé comme révélateur des acides aminés. C'est un oxydant puissant qui par une désamination oxydative des acides aminés conduit à l'aldéhyde correspondant avec libération d'ammoniac, de CO₂ et formation de Ninhydrine réduite, l'hydrindantine. Dans un second temps l'ammoniac réagit avec l'hydrindantine et une autre molécule de ninhydrine.

Les acides aminés soufrés ont tendance à former avec l'acétate de plomb, du sulfure de plomb (PbS) avec le soufre libéré par ébullition en milieu alcalin.

Réaction caractéristique du noyau indole et spécifique du tryptophane. En milieu acide, à froid réaction de condensation avec certains aldéhydes (acide glyoxylique CHO-COOH, méthanal HCOH, p-diméthyl amino-benzaldéhyde, ...).

Réaction de Biuret qui caractérise la liaison peptidique; elle s'applique donc à l'analyse qualitative des protéines et des peptides.

Objectifs :

Dans le cadre de ce TP nous nous limiterons à la caractérisation des acides aminés et des protéines.

2. Protocole expérimental

1. Préparation des solutions de protéine et des acides aminés

Solutions de protéines; Les volumes des solutions sont fixés à 50 mL

Albumine, caséine à 5 g/L, 2ml de blanc d'œuf, poudre de lait 0.2g/2ml.

Solutions d'acides aminés; Les volumes des solutions sont fixés à 50 mL

L-Acide glutamique 1 g/L, Alanine 1 g/L, L-Arginine monohydrochloride 1 g/L, L-glutamine 1 g/L, L-glycine aminoacetic acid 1 g/L, L-leucine 1 g/L, L-méthionine 1 g/L, Lysine 1 g/L, Phenylalanine 1 g/L, L-Tryptophane 1 g/L.

Solution de ninhydrine à 0.5% ; Le volume de la solution est fixé à 100 mL

0,5g de ninhydrine dans 100 ml d'ethanol à 95%.

Solution de lessive de soude 50% ; Le volume de la solution est fixé à 100 mL

50g d'hydroxyde de sodium dans 100 ml d'eau (Attention utilisation de gant recommandée).

Solution d'acétate de plomb à 10 %; Le volume de la solution est fixé à 10 mL

1g d'acétate de plomb dans 10ml d'eau.

Solution d'hydroxyde de potassium à 10 % ; Le volume de la solution est fixé à 10 mL

1g d'hydroxyde de potassium dans 10ml d'eau.

Solution de naphthol-1 à 0,1 % ; Le volume de la solution est fixé à 10 mL

0.01g de naphthol-1 dans 10ml d'éthanol.

Solution d'urée à 5 % ; Le volume de la solution est fixé à 10 mL

0.5g d'urée dans 10ml d'eau.

Solution d'Hypobromite ; Le volume de la solution est fixé à 10 mL

0.2 de brome, NaOH 0.05 g dissoudre dans 10ml d'eau distillée.

Solution de réactif glyoxylique; Le volume de la solution est fixé à 10 mL

0.5 g d'hydrate de chloral, 0.5g carbonate de calcium, eau 10 ml. Porter à ébullition pendant 5 min, filtrer puis compléter à 10 ml avec de l'eau distillée.

Solution de sulfate de cuivre à 1% ; Le volume de la solution est fixé à 10 mL.

0.1g de sulfate de cuivre dans 10 ml d'eau.

2. Réaction à la ninhydrine

Dans un tube à essai placer :

2mL de la solution de protéine ou d'acide aminé.

1ml d'une solution fraîche de ninhydrine à 0,5 %.

Mélanger dans le vortex (N'oubliez pas de fermer les tubes avec un bouchon) et placer au bain-marie environ 1 min30 à l'ébullition. Notez la coloration.

Lecture de chaque tube au spectrophotomètre à DO 570nm

3. Réaction des acides aminés soufrés (Cystéine, Méthionine)

Dans un tube à essai placer :

2mL de la solution de protéine ou d'acide aminé.

3ml de lessive de soude.

Porter à ébullition 3 min dans le bain marie puis ajouter 10 gouttes d'acétate de plomb à 10 % (ou de réactif de Courtonne). Noter l'apparition de sulfure de plomb. (ce réactif contient du **plomb** le contenu des tubes ne sera pas jeté à l'évier, mais récupéré en fin de manipulation dans un container).

4. Réaction de Sakaguchi (Arginine)

Caractérisation du groupement guanidine ($\text{NH}=\text{C}-\text{NH}_2$)

Dans un tube à essais placer :

2 mL de solution d'arginine

1 mL de solution d'hydroxyde de potassium à 10 %

2 mL de solution de naphthol-1 à 0,1 %

1 mL d'urée à 5 %

Mélanger puis ajouter lentement 2 mL de solution d'hypobromite.

Notez la coloration.

5. Réaction d'Adamkiewicz-Hopkins (Tryptophane)

Réaction caractéristique du noyau indole et spécifique du tryptophane.

Dans un tube à essais placer :

2 mL de solution de tryptophane.

2 mL de réactif glyoxylique.

Mélanger et introduire dans le fond du tube, avec une pipette 4 mL d'acide sulfurique concentré (poire d'aspiration). Noter vos observations.

6. Réaction DU BIURET (peptides à partir de 3 à 4 liaisons peptidiques)

Dans un tube à essai placer

2 mL de solution de protéine

Alcaliniser par 4 mL de lessive de soude

Ajouter goutte à goutte une solution de CuSO₄ à 1%.

Noter vos observations.

Lecture de chaque tube au spectrophotomètre à DO 540nm

Travaux Pratiques : BIOCHIMIE

TP 6 : Dosage des protéines totales d'un échantillon.

Les méthodes de dosage des protéines totales sont nombreuses et présentent chacune des caractéristiques différentes : sensibilité, interférents, réponse plus ou moins différente selon la composition en acides aminés. Le choix d'une méthode dépend donc du contexte. Citons quelques méthodes : par l'intermédiaire du dosage de l'azote total protéique, par mesure de l'absorbance intrinsèque à 280 nm, par méthodes photométriques après mise en œuvre d'une réaction chimique ou de la fixation d'un colorant.

Dans la suite, on se propose de doser des échantillons protéiques selon 3 méthodes, absorbance intrinsèque à 280 nm, photométrie à 540 nm après réaction du biuret, photométrie à 562 nm après réaction au Cu(II) et révélation à l'acide bicinchoninique (méthode dite au BCA).

Il est souvent nécessaire de connaître la concentration totale de l'ensemble des différentes protéines d'un milieu, par exemple pour suivre les différentes étapes d'une purification. Malheureusement, vu l'hétérogénéité des protéines, l'intensité de la réaction choisie (biuret, Lowry, Bradford etc.) est très variable d'une protéine à l'autre et le résultat global dépend de la nature des protéines présentes et de leur composition relative.

La méthode de biuret c'est de loin la technique la plus générale utilisée pour le dosage des protéines.

2. Dosage des protéines par méthode du biuret

a) Principe

Pour toute chaîne polypeptidique contenant au moins 2 liaisons peptidiques, les liaisons peptidiques forment, en milieu très alcalin, un complexe coloré avec les ions Cu^{2+} . Si on met en œuvre un réactif standardisé, en excès, on peut ainsi doser les protéines par colorimétrie à 540 nm (**Figure 1**).

Le réactif standardise utilisé est appelé réactif de Gornall (la concentration en Cu^{2+} , en OH^- est standardisée, il contient du KI : 1,5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ pour 6 g de tartrate double de sodium et de potassium et 30 g de NaOH et 1 g de KI).

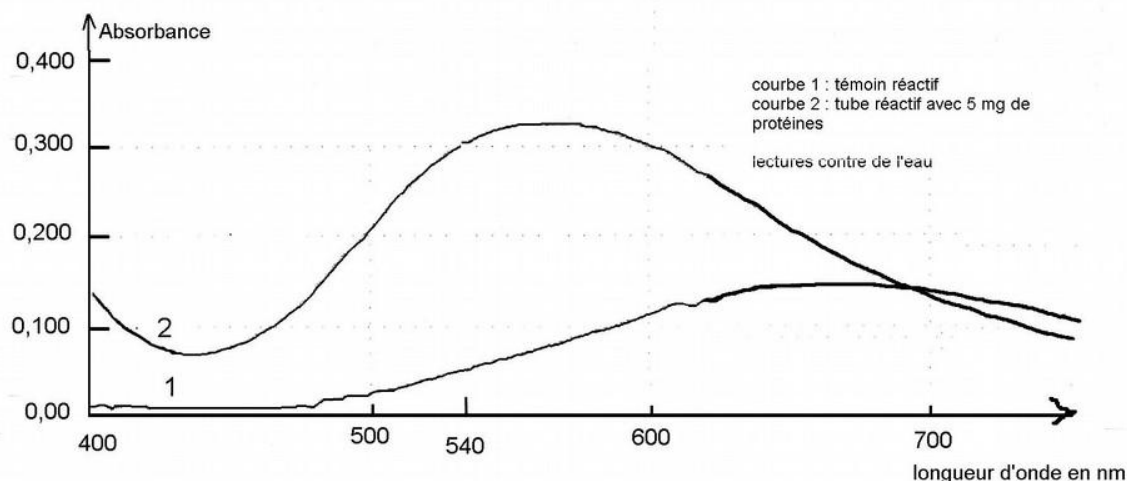


Figure 1 : La molécule de biuret donne la même réaction que les liaisons peptidiques avec les ions Cu^{2+} , c'est pourquoi la méthode a été appelée méthode du biuret.

b) Qualités de la méthode

Méthode de mise en œuvre très simple et très peu onéreuse. La méthode possède une sensibilité influencée par la nature (composition en aminoacides) des protéines à doser : il y a par exemple un effet proline, hydroxyproline et cystéine. La méthode est malheureusement peu sensible. Elle n'est applicable que des milieux très concentrés en protéines (plus de 0,8 mg/mL). C'est justement le cas du plasma sanguin. Dou son utilisation en analyses médicales. De très nombreuses substances portant des fonctions amines ou amides interfèrent avec la réaction de dosage. Cependant les interférents sériques sont négligeables, d'où l'utilisation en analyses médicales.

c) Modes opératoires

Le mode opératoire type est le suivant :

- Échantillon a doser ou étalon qsp 1 mL avec une solution de NaCl a 9 g/L. 0,8 a 10 mg de protéines par tube. (Les dilutions éventuelles des solutions protéiques sont réalisées en NaCl a 9 g/L.)
- réactif de Gornall 4 mL (réactif tres stable) ;
- homogénéiser, attendre 30 minutes a l'obscurité et lire au spectrophotomètre a 540 nm.

Adapter la méthode en utilisant les données du tableau ci dessous a compléter.

Mesurer les protéines totales des extraits enzymatiques préparés.

	TR	1	2	3	4	5
Étalon SAB 5mg/mL en NaCl 0,15 M	0					
NaCl 0,15 M						
Réactif de Gornall	200 μ L					
Protéines par tube réactionnel (q en μ g)	0					
Recouvrir. Homogénéiser sur agitateur, incuber 40 minutes a 37°C puis remettre a température ambiante.						
Lire les absorbances (A) entre 540 et 590 nm contre le TR. Étalonnage $A = f(q)$ par régression linéaire.						

d) Gamme d'étalonnage

A partir d'une solution étalon d'albumine à 10,0 g/L, réaliser une gamme d'étalonnage de 5 tubes selon le tableau (à compléter) suivant :

Tube N°	0	1	2	3	4	5	X
Etalon (10g/L) ml	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1	0
Solution X (ml)	0	0	0	0	0	0	1
Eau physiologique (ml)	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0	0
Réactif de Gornall (ml)	4	4	4	4	4	4	4
Protéine par tube (mg)							
Mélanger et placer les tubes 30 min à l'obscurité pour développer la coloration.							
DO540nm							

e) Résultats

- Compléter le tableau ci-dessus.
- Tracer la courbe d'étalonnage : A = f (quantité de protéines/tube) sur papier millimétré.
- Calculer la concentration de la protéine en g/L dans la solution X puis en déduire la teneur en protéines pour 100 g.

I. RAPPEL DE QUELQUES DEFINITIONS EN CHIMIE ET BIOCHIMIE

Poids moléculaire du glucose = 180,156 signifie : 1 mole de glucose pèse 180,156 g.

Poids moléculaire de l'albumine = 68 000 signifie : 1 mole d'albumine pèse 68 000 g ou 68 Kg.

A. MOLE D'EQUIVALENT (ou équivalent)

Une mole d'équivalent est la quantité d'acide pouvant libérer une mole d'ion H_3O^+ au cours d'une réaction de neutralisation.

□ **Exemple 1** : 1 mole d'acide chlorhydrique (HCl) libère 1 équivalent.

1 mole d'acide sulfurique (H_2SO_4) libère 2 équivalents.

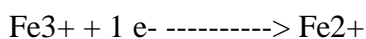
· C'est la quantité de base susceptible de neutraliser une mole d'équivalent acide.

□ **Exemple 2** : 1 mole de soude (NaOH) neutralise 1 mole de HCl. C'est-à-dire un équivalent d'acide ; d'où 1 mole de NaOH correspond à un équivalent.

□ **Exemple 3** : 1/2 mole de chaux ($Ca(OH)_2$) neutralise 1 mole de HCl. C'est-à-dire un équivalent d'acide ; d'où 1/2 mole de $Ca(OH)_2$ correspond à un équivalent.

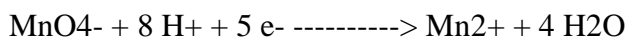
C'est la quantité d'agent oxydant (ou réducteur) capable de capter (ou de céder) une mole d'électrons.

□ **Exemple 4** : soit une mole d'ions d'agent oxydant Fe^{3+} pouvant capter une mole d'électrons suivant la réaction :



Une mole d'ions Fe^{3+} correspond à une mole d'équivalent.

□ **Exemple 5** : soit une mole d'ions MnO_4^- pouvant capter 5 moles d'électrons suivant la réaction :



D'où 1/5 de mole d'ions MnO_4^- correspondant à 1 mole d'équivalent.

B. NORMALITE

· La normalité d'une solution acide (symbole : N) indique la quantité de moles d'ions H⁺ ou H₃O⁺, libérables au cours d'une réaction de neutralisation, que cette solution contient dans un litre, donc le nombre d'équivalents.

□ **Exemple 6** : une solution 2N de HCl contient 2 équivalents par litre, ou 2 moles de HCl par litre.

□ **Exemple 7** : une solution 0,1N de H₂SO₄ contient 0,1 équivalent par litre, ou 0,05 mole par litre de H₂SO₄.

· La normalité d'une solution de BASE indique le nombre d'équivalent d'acide qu'un litre de cette solution peut neutraliser.

□ **Exemple 8** : 1 litre d'une solution de soude 0,5N neutralise 0,5 équivalent d'acide.

· La normalité d'une solution d'un agent oxydant (ou réducteur) indique le nombre de moles d'équivalents de cet agent que contient un litre de solution.

On dit qu'une solution est NORMALE quand elle contient une mole d'équivalent d'acide, de base ou d'agent oxydant (ou réducteur) par litre.

On peut déduire des définitions précédentes que :

- Deux solutions de même normalité réagissent volume à volume.

- Pour qu'une réaction soit quantitative, il faut mettre en présence autant d'équivalents d'un réactif que de l'autre.

C. MOLARITE

La molarité d'une solution d'acide, de base, d'agent oxydant (ou réducteur) indique le nombre de moles d'acide, de base, d'agent oxydant (ou réducteur) qu'elle contient par litre. Souvent dans les réactions biochimiques, il est nécessaire de connaître le nombre de mole d'une substance dans la solution, et celle-ci peut être facilement déduite à partir de la molarité de la solution et le volume présent.

· Une solution molaire (M) = 1 mol/l = 1 mmol/ml = 1 μmol/μl

· Une solution millimolaire (mM) = 1 mmol/l = 1 μmol/ml

D. RAPPORT ENTRE NORMALITE ET MOLARITE

Si n est le nombre de moles équivalent contenu dans une mole d'acide, de base ou d'agent oxydant (ou réducteur), on a la relation :

$$\text{NORMALITE} = \text{MOLARITE} \times n$$

□ **Exemple 9** : 1 mole de H_2SO_4 contient 2 moles d'ions H^+ donc 2 moles d'équivalent ; donc $n = 2$; une solution molaire de H_2SO_4 sera donc 2N.

E. CONCENTRATION MASSIQUE

C'est la MASSE en grammes de soluté par litre de solution.

□ **Exemple 10** : NaCl à 10 g/litre.

F. CONCENTRATION EN POURCENTAGE

C'est la masse en grammes de soluté pour 100 g de solution.

□ **Exemple 11** : Sulfate d'ammonium à 33% quand c'est % (P/P), si non le plus utilisé est le % (P/V). Mais il faut éviter d'utiliser le terme %, à moins qu'il soit clairement défini, car il peut conduire à des confusions.

□ **Exemple 12** : une solution d'acide acétique à 2 % peut signifier :

- 2 g d'acide acétique par 100 g d'eau (p/p),
- 2 g d'acide acétique par 100 ml d'eau (p/v),
- 2 ml d'acide acétique par 100 ml d'eau (v/v).

REMARQUE : Lors de la préparation d'une solution à x %, on tient compte de la densité du solvant, lorsque le soluté est liquide.

□ **Exemple 13** : solution commercial d'acide sulfurique concentré. Une telle solution contient 95 % d'acide sulfurique, autrement dit 95 g d'acide pour 100 g de solution. La densité de la solution est de 1,84 (1 ml pèse 1,84 g), ce qui veut dire que pour avoir 100 g de solution (ou 95 g d'acide) on prélèvera $100 \text{ ml} / 1,84$, soit 54,3 ml de solution commerciale.

G. OSMOLARITE

Pour votre curiosité l'osmolarité est égale à la molarité des particules dans une solution. Une solution d'1 mol/l formé de solutés non dissociables est 1 Osmolar (la solution contient 6,023 10²³ particules/litre). Une solution de 1 mol/l de NaCl (soluté dissociable) est de 2 Osmolar (2 est le nombre d'ions produit par molécule). Une solution de KCl 0,03 mol/l est 0,06 Osmolar. L'osmolarité est souvent utilisée en physiologie pour préparer les milieux physiologiques d'incubations des tissus et cellules.

H. FORCE IONIQUE

M_i = la molarité de l'ion,

Z_i = la charge nette de l'ion (indépendamment du signe),

Σ = symbole signifiant « la somme de ».

La force ionique mesure la concentration des charges dans une solution. Quand la force ionique d'une solution augmente, le coefficient d'activité d'un ion diminue.

La relation entre la force ionique et la molarité dépend du nombre des ions produits et leur charge net.

Type indique la charge nette des ions. Donc $MgSO_4$, qui produit Mg^{2+} et SO_4^{2-} est appelé sel 2 : 2. $NaHPO_4$, qui produit Na^+ et HPO_4^{2-} est appelé sel 2 : 1. Les produits non ioniques ou portant un nombre égal de charges négatives et positives (ex. acides aminés) ne contribuent pas à la force ionique d'une solution.

Références bibliographiques :

PACE, VAJDOS, FEE, GRIMSLEY, GRAY, How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein, *Protein Science* (1995), 4:2411-2423.

Moore, Total Protein Methods and Their Potential Utility to Reduce the Risk of Food Protein Adulteration, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, vol. 9(4), 330-357.

M.P. Deutscher, *Methods in Enzymology*, vol. 182 (1990).

Peterson G. L., *Anal. Biochem.*, (1977) 83, 346.

S. Tsuyoshi Ohnishi, J.K. Barr, *Methods in Enzymology*, vol. xx (1978).

Smith, P.K. et al., *Anal. Biochem.*, 150, 76-85, (1985).

M. C. Michel, Geneviève Hannequart. DOSAGE DES ACIDES AMINÉS ET AMINES PAR LA NINHYDRINE. AMÉLIORATION PRATIQUE. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique*, 1968, 8 (4), pp.557-563.

D. Loncle, *Génie enzymatique*, Doin éditeur, 1992.