
DUT : AGRO-INDUSTRIE
Travaux Pratiques de Biochimie
Manuel de l'étudiant



Réalisé par : Pr Khalid BOUTOIAL
Année universitaire : 2020/2021

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	2
LE MATERIEL DU LABORATOIRE.....	4
TP1. IDENTIFICATION DES GLUCIDES	7
TP 2 : DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DES SUCRES REDUCTEURS : DOSAGE DU GLUCOSE PAR LE DNS.....	17
TP 3. DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE L'AMIDON TOTAL, L'AMYLOSE ET L'AMYOPECTINE PH-METRIE	20
TP 4: TITRATION DES ACIDES AMINES	24
TP 5. SEPARATION DES ACIDES AMINES D'UN MELANGE PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE.....	27
INFORMATIONS GENERALES SUR LES DANGERS DE PRODUITS CHIMIQUES	30

Avant-propos

Les manipulations qui rentrent dans le cadre des travaux pratiques apportées dans ce polycopié sont mis à la disposition des étudiants de la 1ère année de DUT Agro-Industrie. Elles tendent à faciliter aux étudiants de comprendre et d'appliquer les notions vues au cours de Biochimie.

Chaque méthode appliquée présentera d'une part des avantages tels que : exactitude, robustesse, sensibilité et rapidité et d'autre part des inconvénients tels que incertitude et lenteur.

Voici quelques conseils pour la pratique des manipulations de Biochimie

- Opérez avec soin et avec méthode tout en se protégeant
- Vérifiez la propreté de la verrerie. Si le matériel semble souillé, il faut le laver et le rincer à l'eau et faire un dernier rinçage à l'eau distillée.
- La paillasse devra toujours être propre et dans tous les cas rangée et nettoyée parfaitement à la fin de la manipulation ainsi que la verrerie. Toute trace de produit accidentellement renversé sur la paillasse sera rapidement enlevée.
- Le port de la blouse est obligatoire
- Le port des lunettes de sécurité est obligatoire pour toute manipulation de produits dangereux (acides et bases (même dilués), solvants, manipulation sous hotte ou devant une flamme).
- Les réactifs seront toujours rangés et les flacons rebouchés après usage.
- Présentez et interprétez l'ensemble des résultats de façon logique.
- Notez les observations au fur et à mesure de la manipulation.

Pour toutes les séances, vous devez disposer d'une blouse, trousse, règle, calculatrice, papier brouillon et millimétré.

Les sacs et vêtements devront être déposés à l'entrée de la salle.

Les fiches de résultats à rendre en fin de séance vous seront données le jour du TP.

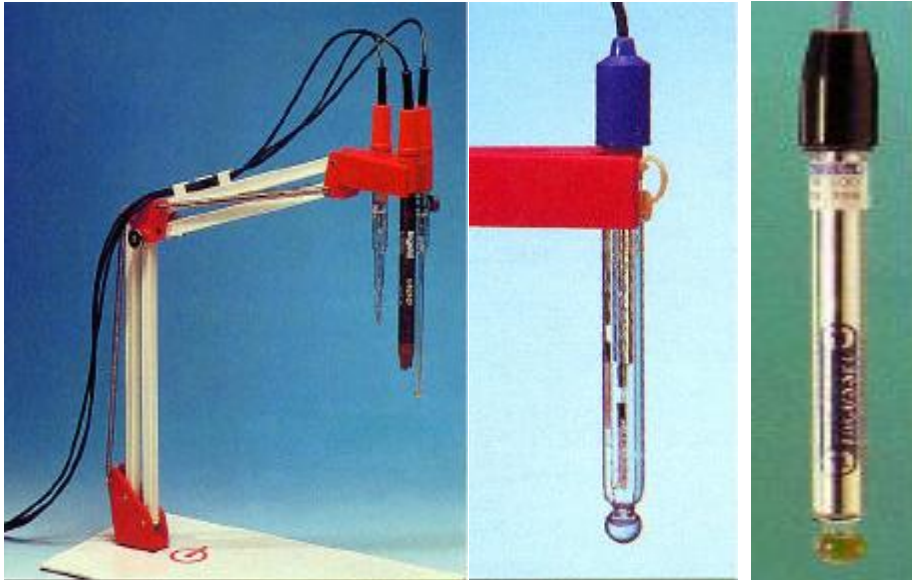
A la fin de la manipulation, vous devrez rendre une fiche de résultats par binôme.

Pour tirer profit de ces TP, lisez avec attention le protocole et revoyez les notions nécessaires pour la compréhension des manipulations avant la séance.

I. Le matériel du laboratoire

a) Les appareils de mesure

- pH-mètre



- Spectrophotométrie

Il s'agit d'une technique d'analyse basée sur l'absorption de la lumière (U.V, Visible, I.R.).

✓ *La loi de Beer-Lambert*

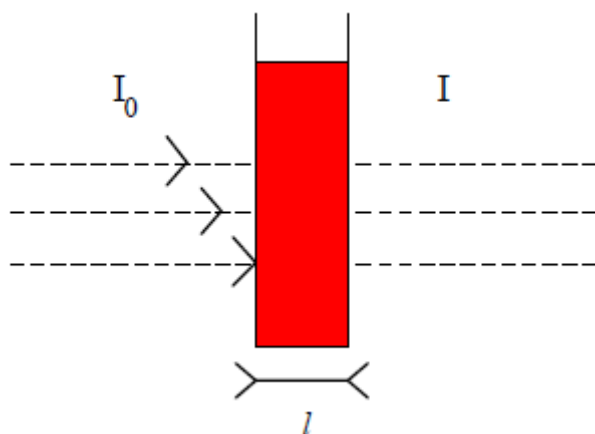
Supposons qu'un faisceau de lumière monochromatique traverse une épaisseur l de solution contenant une espèce absorbante à la concentration C . Appelons I_0 l'intensité du faisceau incident et I ($I < I_0$) celle du faisceau transmis (voir schéma).

On appelle transmittance la quantité : $T = I/I_0$

On appelle absorbance la quantité $A \lg(I_0/I)$

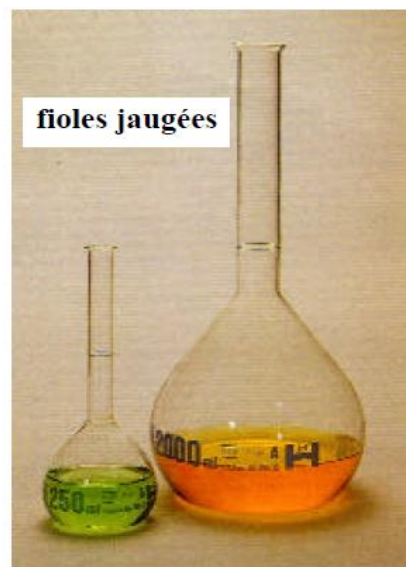
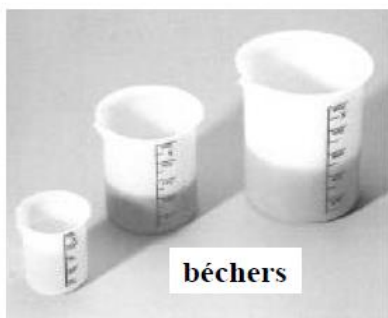
Pour les solutions diluées, l'influence de la concentration de l'espèce absorbante sur l'absorbance est donnée par la loi de Beer-Lambert:

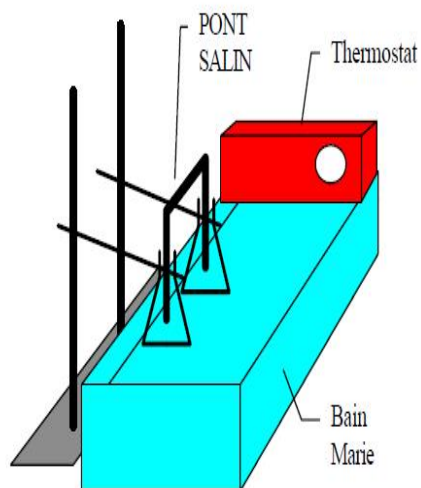
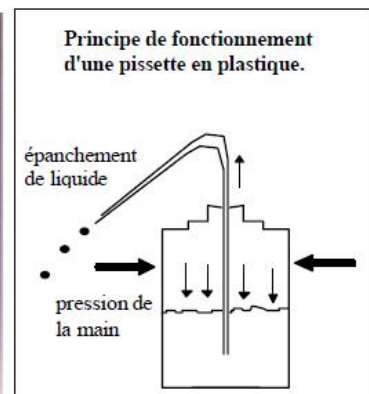
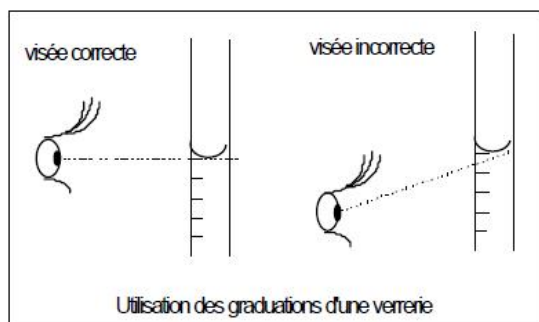
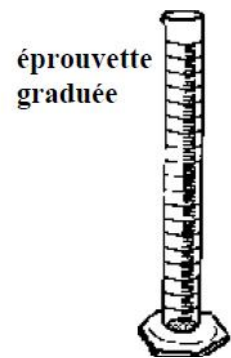
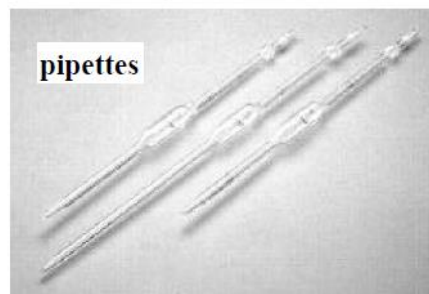
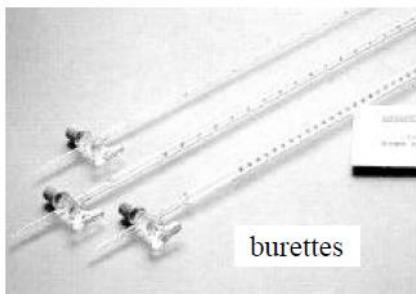
$$A = \epsilon.l.C$$



Par commodité, l est exprimée en cm et C en mol.L^{-1} . Le coefficient ϵ est caractéristique, à une longueur d'onde donnée, de la substance absorbante; on l'appelle coefficient d'absorption molaire et il s'exprime en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Par application de la loi de Beer-Lambert, il est donc possible de déterminer une concentration par une mesure d'absorbance.

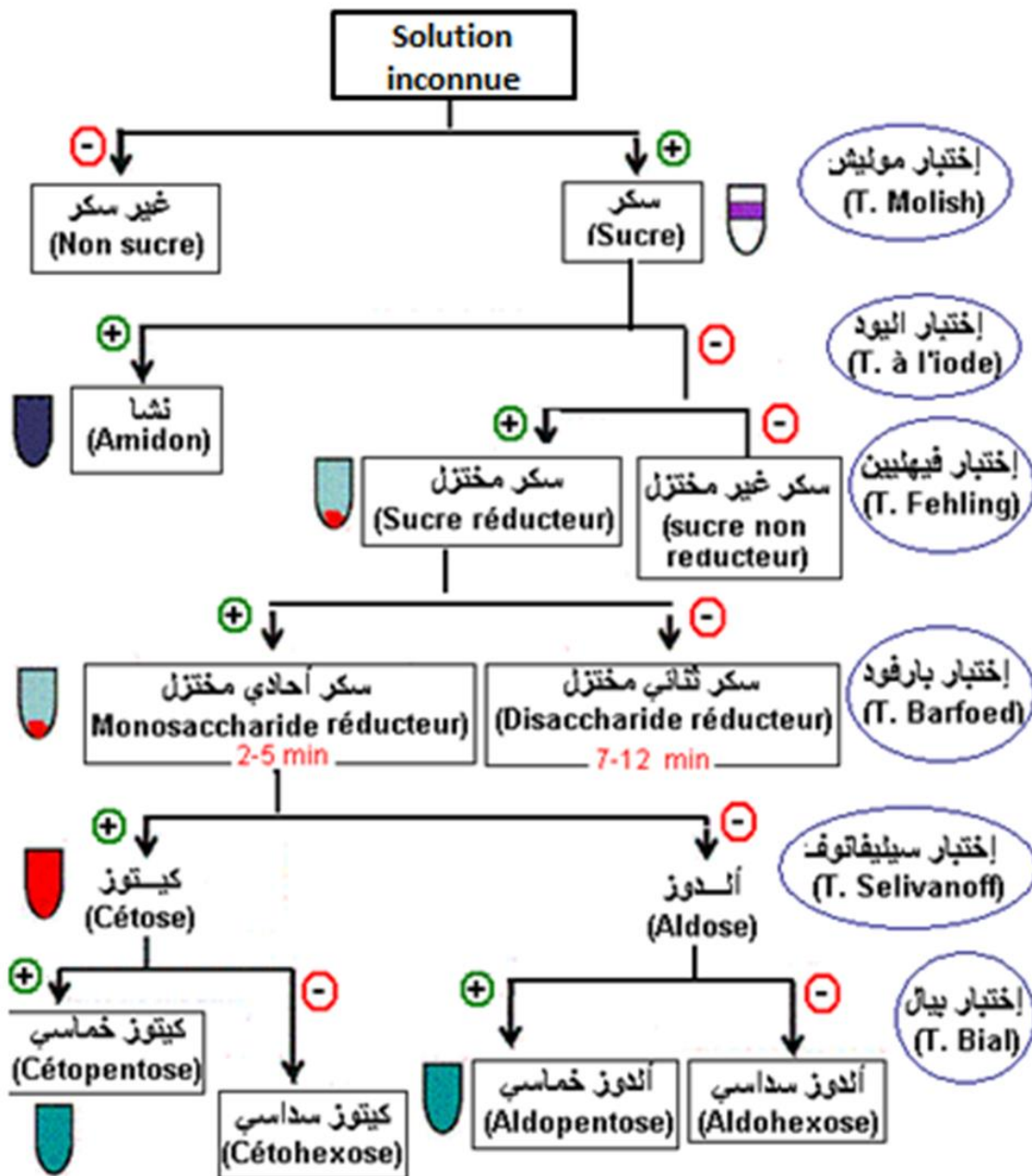
b) La verrerie, Les contenants





TP1 : Identification des glucides

L'objectif global de TP est d'identifier la nature de 5 solutions inconnues en suivant les réactions suivantes :



I. Test de Molish

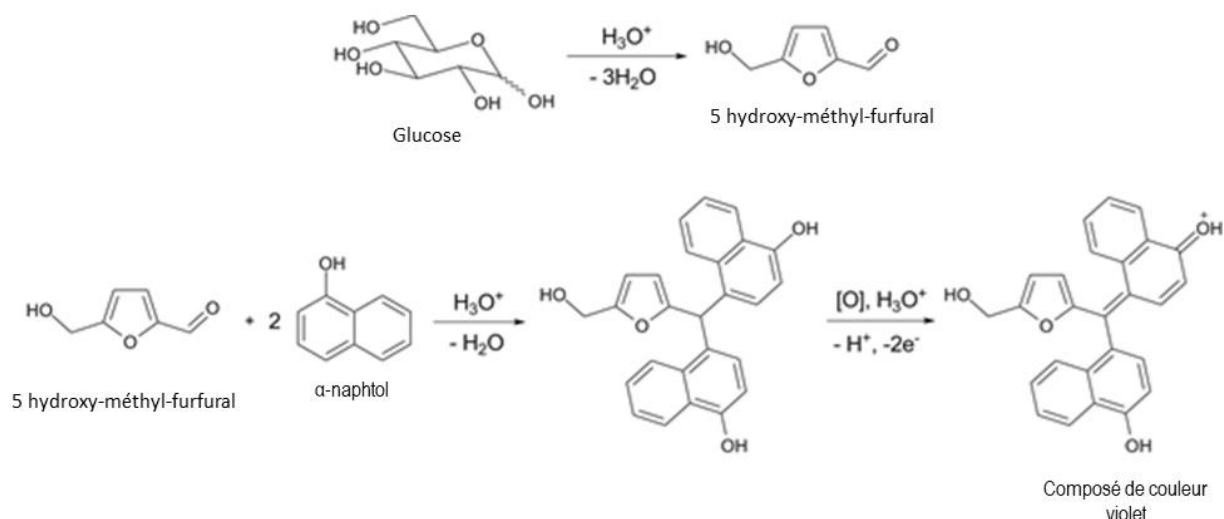
I.1. But

Le but du test est la mise en évidence des sucres parmi d'autres composés. C'est une réaction générale à tous les sucres (oses ou osides)

I.2. Principe

En milieu acide concentré et à chaud, les oses se transforment en furfural (pour les pentoses) et hydroxy-méthyl-furfural (pour les hexoses) par cyclisation et déshydratation. Une solution contenant le sucre, en présence de phénol comme α -naphthol donne des colorations caractéristiques, un anneau rouge violacé apparaît à l'interface acide sulfurique-solution.

La réaction se déroule selon les étapes suivantes :



Étapes de déroulement de l'expérience de Molish

I.3. Réactifs

- Acide sulfurique concentré
- Réactif de Molish (α -naphthol)
- Solutions à tester

I.4. Mode opératoire

Chaque groupe des étudiants aura 5 tubes (solution non sucrée, solution d'un polysaccharide, un sucre non réducteur et 2 solutions des monosaccharides) avec 2ml des solutions inconnues.

- Ajouter à chaque tube 2 gouttes de réactif de Molish et agiter les tubes pour mélanger les contenus.
- Sous la hotte, couler doucement 2 ml de H_2SO_4 concentré au long de la paroi de chaque tube.

Observer sans mélanger : une réaction positive se manifeste par l'apparition d'un anneau rouge-violet à l'interface d'acide sulfurique-solution de sucre.

N.B. La réaction est exothermique (échauffement de tube, ne pas tenir le tube à la main).

II. Test à l'iode

II.1. But

Le test est utilisé pour la mise en évidence des polysaccharides en présence d'iode.

II.2. Principe

Le lugol ou l'eau iodée se fixe sur les chaînes polysaccharidiques pour donner des complexes colorés (une mole d'I₂ se fixe sur chaque tour de spire de l'amidon). La réaction du lugol avec le glycogène donne une coloration brune alors qu'on obtient une coloration bleue avec l'amidon.

II.3. Réactifs

- Lugol ou solution d'iode.
- Sucres : Solutions de sucre à 1% dans l'eau.
- HCl à 1N.

II.4. Mode opératoire

A 2 ml des solutions sucrés

- Ajouter 1 ml d'HCl 1N à chaque tube.
- Ajouter 1 à 2 gouttes du lugol dilué.
- Observer et noter les colorations obtenues.

Réaction positive: l'amidon (polysaccharide) donne une couleur bleue. Le glycogène (polysaccharide) présente une couleur brun-rouge. Couleur jaune indique que la solution contient mono ou oligosaccharide.

III. Test à la liqueur de Fehling

III.1.1 But

Le but du test est la mise en évidence du pouvoir réducteur des sucres (présence d'une fonction hémi-acétale libre).

III.2. Principe

En milieu alcalin et à chaud, les oses et les oligosaccharides peuvent s'oxyder et en même temps réduire des substances telles que les sels métalliques. On parle des sucres réducteurs (la présence de fonction hémi-acétale libre).

L'ion cuivrique Cu^{2+} , de couleur bleue, est réduit en ion cuivreux Cu^+ par le groupement carbonyle des oses pour donner de l'oxyde cuivreux Cu_2O de couleur rouge qui précipite.

Si la réaction est positive, on obtient un précipité rouge brique dont la quantité est proportionnelle à celle du sucre réducteur présent.

III.3. Réactifs

- La liqueur de Fehling est composée de deux solutions A et B :

Solution A : 35 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ + 5 ml H_2SO_4 concentré + H_2O (compléter à 1L).

Solution B: 150 g tartrate de K + 300 ml NaOH 10% + H_2O (compléter à 1L)

- Sucres : Solutions à 1%

III.4. Mode opératoire

- Mettez dans chaque tube 1 ml de la solution A puis 1 ml de la solution B de la liqueur de Fehling.
- Ajoutez 2 ml de chaque solution de sucre correspondant.
- Agiter pour bien mélanger le contenu des tubes
- Porter les tubes à l'ébullition pendant 3 min
- Observer et noter le résultat obtenu :

- ✚ Une réaction positive: Apparition d'un précipité rouge brique dont la quantité est proportionnelle à celle du sucre réducteur présent.

IV. Test de Barfoed

IV.1. But

Le test de Barfoed est utilisé pour distinguer les monosaccharides des disaccharides parmi des sucres réducteurs.

IV.2. Principe

En présence d'un sucre réducteur et à chaud, il y'a formation d'oxyde cuivreux rouge brique insoluble. La réaction est plus rapide quand le sucre réducteur est un ose (5 minutes de chauffage). Elle est plus lente lorsqu'il s'agit d'un disaccharide réducteur (7-12 minutes de chauffage). En effet, par hydrolyse en milieu acide, les oligosaccharides libèrent des unités monosaccharides et finissent par donner un résultat positif, mais après un temps supérieur à 5 min. Si la réaction est positive, on obtient un précipité rouge brique dont la quantité est proportionnelle à celle du sucre réducteur présent.

IV.3. Réactifs

- Réactif de Barfoed : 13,3 g d'acétate de cuivre dans 200 ml d'eau distillée et 8 ml d'acide acétique glacial (coloration bleue).
- Solutions sucrées à 1% (dans l'eau)

IV.4. Mode opératoire

- Dans chaque tube à essai, mettre 1 ml de réactif de Barfoed.
- Ajouter 2 ml de chaque solution sucrée
- Bien agiter les tubes pour une homogénéisation de leurs contenus.
- Porter les tubes à ébullition et noter le temps de chauffage.
- Arrêter le chauffage des tubes après avoir l'apparition d'un précipité rouge brique.
- Une réaction positive: apparition d'un précipité rouge brique :

- ✚ pour les oses (monosaccharides) réducteurs, il y a après chauffage pendant 5 minutes.

✚ Pour les disaccharides réducteurs, le temps de chauffage nécessaire est 7-12 minutes.

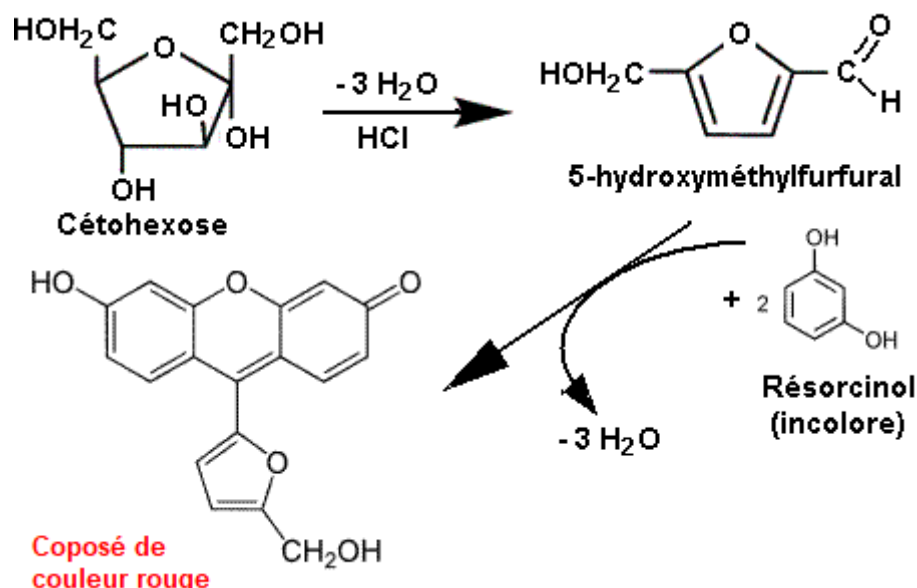
V. Test de Seliwanoff

V.1. But

Le test de Seliwanoff a pour but est distinguer entre les cétooses et les aldoses.

V.2. Principe

En présence d'acide chlorhydrique concentré et à chaud les cétooses se déshydratent rapidement pour donner le 5-hydroxyméthylfurfural qui se condense avec le résorcinol pour former un composé rouge cerise. La réaction se déroule en 2 étapes :



Réaction du test de Seliwanoff

V.3. Réactifs

- Réactif de Seliwanoff: 2 g résorcinol + 33 ml HCl concentré + 100 ml H_2O .
- Solutions sucrées: Solutions à 1% (dans l'eau).

V.4. Mode opératoire

- Dans chaque tube à essai déposer 2 ml de solution de sucre à 1%.
- Ajouter à chaque tube 2 ml du réactif de Seliwanoff et 1 ml d'HCl concentré.
- Chauffer les tubes pendant 5 min au bain-marie bouillant et laisser refroidir.

- Une réaction positive (la présence des cétones), apparition d'un composé de coloration rouge cerise.

VI. Test de Bial

VI.1. But

Le test de Bial a pour objectif de distinguer les pentoses des hexoses.

VI.2. Principe

En milieu acide (dans ce test HCl concentré) et en présence d'ions Fe^{+3} , les pentoses se condensent avec l'Orcinol pour former un composé de coloration verte.

VI.3. Réactifs

- Réactif de Bial : 0,2 g d'Orcinol + 100 ml HCl concentré + 5 gouttes FeCl_3 à 10%
- Solutions sucrées à 1%.

VI.4. Mode opératoire

- Dans chaque tube à essai, mettre 1 ml de réactif de Bial (sous hotte).
- Ajouter dans les tubes 1 ml de la solution de sucre.
- Porter les tubes à l'ébullition et noter la coloration de chaque tube
- Une réaction positive: En présence de pentose, apparition d'une couleur verte bleutée. En présence des hexoses, apparition d'une couleur brune jaunâtre.

Préparation du compte rendu

Pour chaque test recopier le but, principe (illustrer la réaction pour chaque test), le mode opératoire (sous forme de schéma) et les résultats obtenus.

Remplissez le tableau suivant : en mettant (+) pour le résultat positif et (-) pour le résultat négatif.

	Tube A	Tube B	Tube C	Tube D	Tube E	Conclusion (Nature, classe ou type du composé étudié)
Test de Molish						
Test à l'iode						
Test à la liqueur de Fehling						
Test de Barfoed						
Test de Seliwanoff						
Test de Bial						

TP2. DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DES SUCRES REDUCTEURS : DOSAGE DU GLUCOSE PAR LE DNS

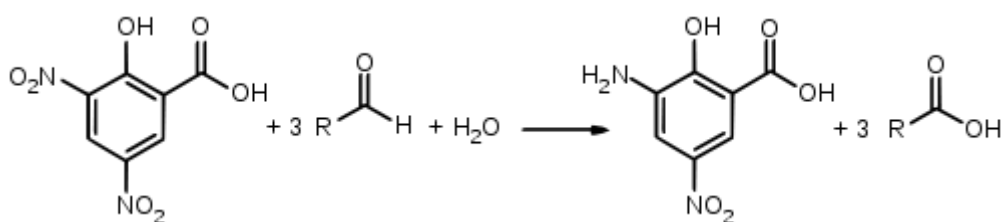
1) Principe

Un ose est qualifié de réducteur seulement si sa forme à chaîne ouverte comporte une fonction aldéhyde ou un groupe hémiacétal libre. Les aldoses, monosaccharides contenant une fonction aldéhyde qui peut être oxydée, font partie de cette famille, contrairement aux cétooses, qui comportent eux une fonction cétone. Cependant, certains cétooses peuvent subir une isomérisation par une série de tautoméries pouvant résulter en l'apparition d'une fonction aldéhyde qui pourra par la suite être oxydée.

En milieu acide et à chaud, les liaisons glycosidiques des carbohydrates sont hydrolysées. Les oses simples ainsi libérés subissent une déshydratation intramoléculaire pour des dérivés furfuriques (furfural ou hydroxyméthyl furfural). La fonction aldéhyde des furfuriques se condense ainsi en milieux acides avec l'hydroxyl d'un composé phénolique pour donner des acétals ou hémi-acétals de couleur rougeâtre qui absorbent dans le visible (450-500 nm). Cette méthode permet ainsi de doser tous les glucides totaux d'un matériel biologique.

L'acide 3,5-dinitrosalicylique est un acide carboxylique avec un pK_A de 2,96 pour le groupe carboxyle et un pK_A de 7,61 pour le groupe phénolique (-OH).

Il réagit avec les oses réducteurs et autres molécules réductrices pour former l'acide 3-amino-5-nitrosalicylique qui absorbe fortement la lumière à 540 nm. Dans cette réaction, la couleur de la solution passe du jaune-orange au rouge.



Il est principalement utilisé dans le dosage de l'alpha-amylase, comme dans le cas des oses réducteurs, combine l'oxydation du groupe carbonyle de l'enzyme avec la réduction d'un groupe nitro du DNS dans un milieu alcalin.

Le dosage du glucose par le DNS est un dosage colorimétrique du glucose.

2) Protocole

a) Matériel

Spectrophotomètre et ses cuves

- Tubes à essai lavés et secs
- Pipette automatique
- Béchers
- Fioles jaugées

b) Solutions

- Solution de glucose à 0,005 mol/L
- DNS
- Eau distillée
- Solution à doser (miel)

c) Étapes

- Préparation de la gamme d'étalonnage

Dans une série de tubes :

- introduire 0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,9 - 1,2 mL de solution de glucose à 0,005 mol/L ;
- ajuster chaque tube à 1,5 mL avec de l'eau distillée ;
- ajouter 1 mL de réactif 3-5 DNS ;
- mélanger et boucher les tubes avec du coton cardé et du papier aluminium ;
- porter au bain marie à 100 °C pendant 5 min exactement ;

- refroidir et ajouter 7,5 mL d'eau distillée dans chaque tube (on suppose que l'évaporation est la même pour chaque tube), homogénéiser et laisser reposer pendant 15 min.

Lire les absorbances à 540 nm contre le blanc (tube no 0).

- Essais

Ils sont à traiter dans les mêmes conditions opératoires.

Réaliser le dosage avec des prises d'essais de 0,5 mL diluées convenablement, additionnées d'1 mL d'eau distillée et d'1 mL de DNS.

Tableau colorimétrique (résultats expérimentaux)						
N° de tube	0	1	2	3	4	5
Solution étalon de glucose à 0,005 mol/L en mL	0	0,2	0,4	0,6	0,9	1,2
Eau distillée en mL (avant chauffage)	1,5	1,3	1,1	0,9	0,6	0,3
DNS en mL	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Eau distillée en mL (après chauffage)	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Quantité de glucose en μmol	0	1,0	2,0	3,0	4,5	6,0

Ce tableau représente ce qui doit être mis dans chaque tube et en quelle quantité.

TP 3 : DOSAGE SPECTROPHOTOMETRIQUE DE L'AMIDON TOTAL, L'AMYLOSE ET L'AMYLOPECTINE

1) Principe

L'amidon (polysaccharides de réserve chez les végétaux) est une macromolécule constituée de deux polymères de D-glucose : Amylose et amylopectine. L'amylose est constitué essentiellement d'unités de D-glucoses unies entre elles par des liaisons de type $\alpha(1-4)$. L'amylopectine consiste essentiellement en unités $\alpha(1-4)$ -D-glucosidiques linéaires mais branchée, par des liaisons de type $\alpha(1-6)$ -D-glucosidiques à tous les 24-30 unités de glucose. L'amylopectine contient plus de 106 résidus de D-glucose, la rendant ainsi la macromolécule biologique la plus volumineuse qui existe.

L'iode (I_2) interagit avec l'amylose et l'amylopectine pour donner une coloration respectivement bleue et brune.

Les spectres des complexes I_2 -amylose et I_2 -amylopectine sont différents. De ce fait ces complexes ont des longueurs d'ondes maximales pour l'amylose ($\lambda_{\text{max}} = 630 \text{ nm}$) et l'amylopectine ($\lambda_{\text{max}} = 548 \text{ nm}$) qui sont différentes. En plus l'amylose absorbe dans le proche visible tandis que l'amylopectine n'y absorbe pas. On peut donc utiliser cette différence spectrale pour doser simultanément l'amidon total, l'amylose et l'amylopectine dans un matériel biologique. Dans cette manipulation on considérera que l'absorbance à 580 nm est liée à la fois à l'amylose et à l'amylopectine, par contre l'absorbance à 720 nm est liée essentiellement à l'amylose.

2) Matériels et réactifs

- Bain –marie
- Spectrophotomètre UV-visible

- Tubes à essais
- Centrifugeuse
- Plaques chauffantes
- Réactif de l'iode : faire dissoudre 0,2 g dans 100 ml d'une solution de KI (2 % (w /v) dans HCl à 0.1 N).
- Amidon de pomme de terre
- KOH (1 N)
- HCl (1 N)

3) Mode opératoire

a) Courbe d'étalonnage de l'amidon standard

A 100 ml d'eau distillé bouillante ajouter 0,5 g d'amidon, agiter légèrement le mélange et continuer l'ébullition pendant 5 min sur une plaque chauffante pour obtenir une solution d'amidon limpide. Refroidir le mélange et le compléter à un volume de 100 ml avec l'eau distillée (solution mère).

La courbe d'étalonnage est établie selon le tableau ci-dessous :

Réactif /tube	T=0 (Blanc)	T=1	T=2	T=3	T=4	T=5	T=6	T=7	T=8	T=9	T=10
Amidon (5 mg/ml) en ml	0	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09	0.10
H ₂ O (ml)	4.9	4.89	4.88	4.87	4.86	4.85	4.84	4.83	4.82	4.81	4.8
Réactif I ₂ /KI (ml)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Calculer la conc d' amidon (mg/ml)											
Durée d'incubation	10 min avant les lectures des DOs										
DO1 (580 nm)											
DO2 (720 nm)											
Moy DO1											
Moy DO2											

Tracer les courbes d'étalonnage de chaque composé et déterminer l'équation de la droite ?

b) Préparation de l'échantillon à analyser

Prendre 0.1 g de farine de matériel biologique bien broyé et y ajouter 5 ml de KOH (1 N).

Bien homogénéiser la solution à la température ambiante et la neutraliser ensuite avec 5 ml de HCl (1 N).

Assurer bien que la solution est neutre à l'aide d'un pH-mètre. Mettre ensuite le mélange en ébullition au bain-marie pendant 15 min.

Réajuster le volume du mélange à 10 ml par l'eau distillé. Centrifuger le mélange à 3000 rpm pendant 10 min et prendre le surnageant. Filtrer le surnageant à l'aide d'un papier filtre.

c) Dosage de l'amidon dans le matériel biologique.

Réactif /Echantillon	Blanc	Echantillon 1	Echantillon 2
Echantillon	0	0.05 ml	0.05 ml
H ₂ O	4.90 ml	4.85 ml	4.85 ml
Réactif I2/KI	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Durée d'incubation	10 min avant les lectures des DOs		
Moy DO (580 nm)			
Moy DO (720 nm)			

A l'aide de ces mesures, calculer les proportions d'amidon total, d'amylose et d'amylopectine dans les échantillons.

TP4. TITRATION DES ACIDES AMINES PAR PH-METRIE

1) But et principe

Le cation d'acide aminé A^+ qui est la forme prépondérante en milieu acide peut être considéré comme un diacide. Lorsque le pH augmente, ce diacide perd un premier proton en se transformant en ion mixte (forme zwitterion), puis un deuxième proton quand l'ion mixte se transforme en anion (Voir Figure).

Ces transformations sont réversibles et la proportion de l'une ou de l'autre forme, définie par les lois générales des équilibres chimiques, peut être déterminée par le calcul des constantes de dissociation K_1 et K_2 :

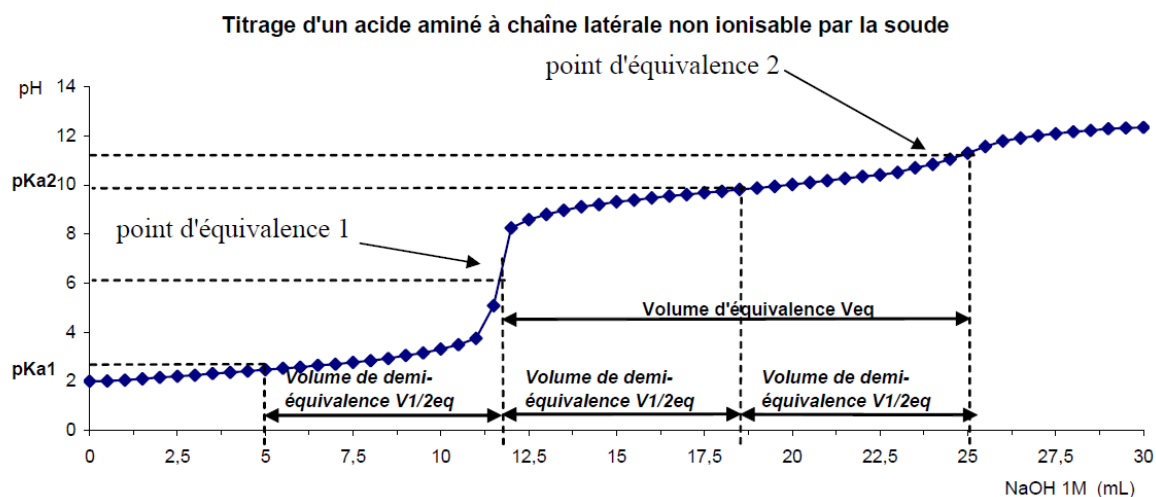
$$K_1 = [H^+] [A^\pm] / [A^+]$$

$$K_2 = [H^+] [A^-] / [A^\pm]$$

Le but de cette manipulation est de déterminer par titrage acido-basique les pK_a et pH_i de deux acides aminés en solution et de déterminer leur concentration.

On détermine dans un premier temps les points d'équivalence graphiquement par la méthode des tangentes parallèles. L'un de ces points sera le pH_i de l'acide aminé. Dans un deuxième temps, il faut déterminer les pK_a correspondants aux constantes de dissociation. Ces points se situent dans des zones de faible variation de pH. L'acide aminé joue un rôle tampon dans les zones de pH voisines de ses pK_a .

Cette méthode permet aussi de doser un acide aminé en solution. Pour cela, il faut déterminer les volumes d'équivalence, ces volumes ne peuvent pas être lus directement sur les graphes mais doivent être calculés entre deux points d'équivalence déterminés graphiquement.



2) Mode opératoire

a- Courbe de titration de la glycine

Dans un bécher de 250 ml, verser 100 ml d'eau distillée et 10 ml de glycine. Placer la solution sous agitation et ajuster le pH à 2 en ajoutant goutte à goutte le HCl 2M avec une pipette (environ 5 ml).

Etablir ensuite la courbe de titration de la solution de la glycine à l'aide de la solution de soude 1M en traçant la courbe du pH en fonction du nombre de ml de soude ajoutés (0,5 ml par 0,5 ml) de pH 2 jusqu'au plateau à pH basique (environ pH 12 à 13).

MM glycine = 75 g/mol.

b- Courbe de titration de la glycine en présence de formaldéhyde

Verser dans un bécher 90 ml d'eau distillée et 10 ml de glycine. Ajouter alors 10 ml de formaldéhyde (formol) et 4 gouttes de phénolphthaléine et ajuster le pH à 2 avec HCl 2M.

Etablir la courbe de titration de la solution de glycine en présence de formol de pH 2 jusqu'au plateau à pH basique (environ pH 12 à 13) avec NaOH 1M.

- Tracer les courbes sur le papier millimétré de pH en fonction du volume NaOH versé en présence et absence de formol, et déterminer graphiquement les zones de pK1, pK2 et pHi dans chaque cas

c- détermination du point isoélectrique du glyco-colle

- Prélever dans un bécher de 100 ml, 25 ml de la solution du glycolle 0,05M, et y ajouter, sous agitation magnétique, un volume de HCl équivalent à 3 mmol d'acide.
- Tremper l'électrode du pH-mètre dans la solution de glycolle acidifiée et noter son Ph.
- Neutraliser la solution de glycolle acidifiée par NaOH 0,1 N , millilitre par millilitre, en notant la valeur de pH après chaque addition, jusqu'à un pH final de 11,5-12.
- Tracer la courbe des pH en fonction du volume de NaOH (0,1N) versé, et déterminer graphiquement les zones de pK_1 , pK_2 et pH_i de glycolle.

TP 5: SEPARATION DES ACIDES AMINES D'UN MELANGE PAR CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE

1) Principe de la chromatographie de partage

Lorsqu'une substance est mise en présence de 2 solvants non miscibles elle se répartit entre ces 2 solvants selon son coefficient de solubilité pour chacun des solvants. Ce coefficient est caractéristique de la substance étudiée, indépendant de sa concentration et n'est pas affecté par la présence d'autres solutés.

Ce principe sera utilisé pour la séparation d'un mélange d'acides aminés par chromatographie sur couche mince. Dans ce type de chromatographie, la phase stationnaire correspond au support polaire, constitué de cellulose fixée sur un film plastique. La phase mobile est constituée d'un solvant apolaire qui migre le long de la phase stationnaire par capillarité. Cette chromatographie est réalisée dans une cuve de verre ou cuve sandwich, close, dont l'atmosphère est saturée par la phase mobile. Le mélange à analyser est déposé à l'une des extrémités de la feuille (voir figure).

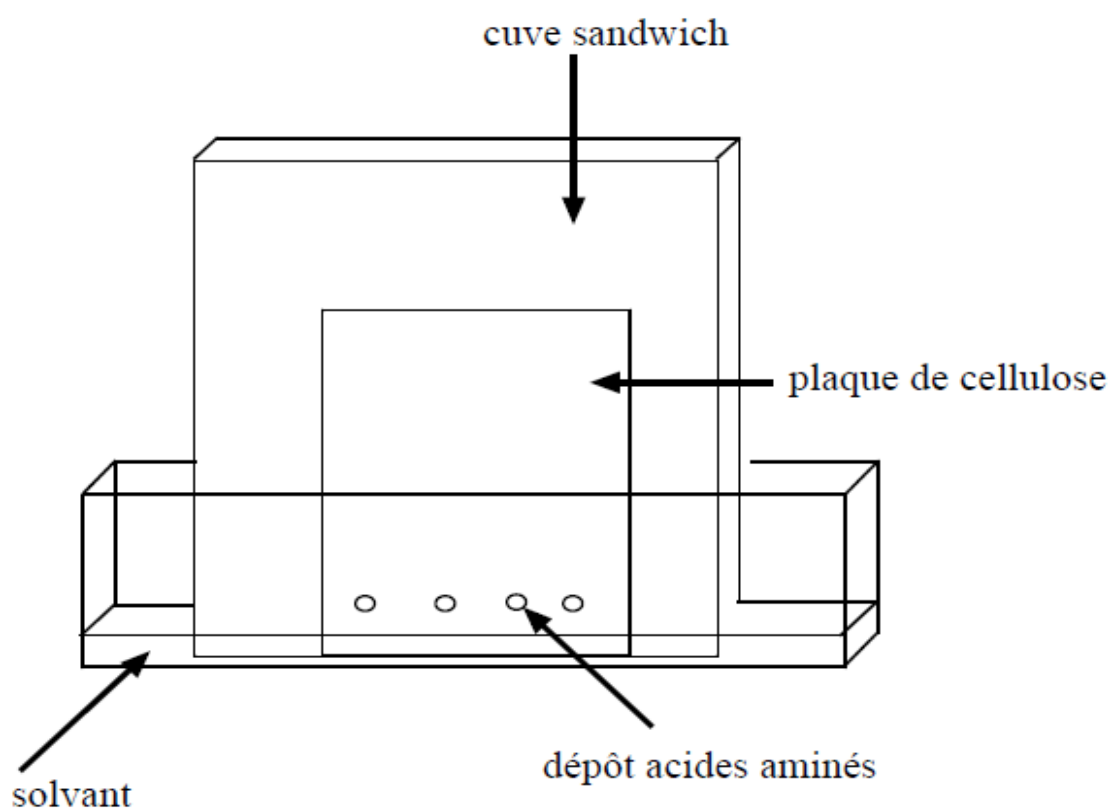


Figure 1 : schéma simplifié du mode de séparation des acides aminés

Cette extrémité est mise en contact avec la phase mobile. Plus les substances du mélange sont solubles dans la phase mobile plus elles migreront sur le support et plus les substances sont solubles dans la phase stationnaire moins elles migreront. La solubilité des acides aminés dans la phase polaire (fixe) ou apolaire (mobile) va dépendre de la structure chimique de leur chaîne latérale, la présence d'atome H, O ou N étant déterminante pour le caractère hydrophile ou hydrophobe.

Afin de pouvoir comparer les migrations on définit le

Rf : Distance parcourue par le composé / Distance parcourue par le solvant

Le Rf est caractéristique d'une substance dans des conditions expérimentales données. Les acides aminés hydrophiles resteront près du dépôt. Les acides aminés hydrophobes seront entraînés dans la phase mobile et migreront loin du dépôt. Dans ces conditions le Rf des acides aminés hydrophiles aura une valeur bien plus faible que le Rf des acides aminés hydrophobes.

Pour identifier un acide aminé inconnu il est nécessaire d'analyser, en parallèle sur la même plaque, des acides aminés connus qui serviront de comparaison. Le Rf des acides aminés connus et inconnus sera alors comparé

2) protocole expérimental

Cette technique va être utilisée pour connaître la composition en acides aminés de tri peptides Hydrolysés.

a) préparation de la plaque de silice

Activer la silice par chauffage dans une étuve à 1000C pendant 30 min.

b) Application des échantillons :

Chaque dépôt de solutions (hydrolysats des acides aminés, de composition inconnue) est effectué avec des capillaires de sorte que le volume déposé en une fois soit de l'ordre de 10 µl afin de donner des dépôts de petite dimension ayant 1 à 3 mm de diamètre.

Tracer la ligne de dépôt à 2 cm du bord inférieur du film avec un crayon.

A partir du bord, délimiter sur cette ligne 8 repères tous les 1 cm. Déposer chaque acide aminé connu (arginine, histidine, proline, glycine, aspartate, acide glutamique) et 2 fois le mélange d'acides aminés à analyser, sur la ligne de dépôt, au milieu de l'intervalle entre les repères. Ces dépôts sont séchés à l'air libre avant de faire la chromatographie.

c) Réalisation de la chromatographie.

Le film sera placé entre les deux plateaux de la cuve. Après avoir fixé les pinces de serrage, on place l'ensemble dans un bac contenant 120 ml du mélange de solvants (Butanol normal 80 ml + Acide acétique concentré. 20 ml + H₂O distillée : 20 ml)

Le mélange monte par capillarité, c'est une chromatographie ascendante.

Quand la phase mobile atteint le sommet du film, le chromatogramme est retiré de la cuve. Le front du solvant est souligné délicatement au crayon à papier. Le film est ensuite séché.

d) Révélation du chromatogramme




Elle est obtenue en pulvérisant sur le film (à faire sous la hotte), une solution de ninhydrine à 0,2% dans le mélange éthanol : acide acétique (4V : 1V) et en séchant ensuite le chromatogramme pendant 2 à 3 minutes dans une étuve à 80°C.

- pour la préparation du mélange éthanol, acide acétique en mesurant 160 ml d'éthanol et en rajoutant 40 ml d'acide acétique (mélange 4V : 1V)

- on dissout les 0,4 g de ninhydrine avec le mélange éthanol-acide acétique de façon que le volume final soit de 200 ml.

C- Résultats : Faire un tableau des valeurs de R_f obtenues pour les acides aminés de référence et ceux du mélange. En déduire la composition du mélange.

- INFORMATIONS GENERALES SUR LES DANGERS DE PRODUITS CHIMIQUES

					
(ether)	(acide nitrique concentré)	(toluène)	(HgCl ₂)	(peroxydes)	(soude)
Inflammable, tenir loin de flammes et de toute source de chaleur	Comburant, éviter tout contact avec des matières combustibles	Nocif ou irritant, produit des lésions légères, irrite la peau et les voies respiratoires	Toxique, peut être mortel par ingestion, contact ou inhalation.	Explosif, danger de réaction spontanée très exothermiques.	Corrosif, détruit les tissus vivants et/ou les matériaux.

Tout produit chimique est potentiellement toxique; on évitera donc de goûter, de sentir ou de toucher.

Méfiez-vous des produits en poudre fine qui peuvent être inhalés. Les risques liés à une mauvaise utilisation de toutes les substances chimiques que vous serez amené à manipuler sont nombreux et variés. On doit toujours se montrer vigilant. Tous les flacons commerciaux comportent une étiquette symbolisant les risques principaux pour la manipulation de leur contenu. C'est une source d'informations qui vous renseigne sur la nature des dangers symbolisés par un pictogramme noir sur un fond jaune - orangé; sur la conduite à tenir en cas d'accident; sur la gestion des déchets.