

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

CONTRÔLE ET DEVELOPPEMENT
EN INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE

L'ordre de déroulement des manipulations sera indiqué aux candidats en début d'épreuve.

Durée : 4 H

BIOCHIMIE

(80 points)

L'utilisation d'enzymes libres ou immobilisées est de plus en plus fréquente en industrie agroalimentaire. On se propose de comparer l'activité d'une protéase, la trypsine, sous forme libre à celle de la trypsine immobilisée et de déterminer le rendement de l'immobilisation.

1 - Dosage colorimétrique des protéines de l'extrait enzymatique. (30 points)**1.1 - Principe.**

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un mélange d'acides phosphotungstique et phosphomolybdique qui, en présence de protéines, est réduit en un complexe de coloration bleue.

1.2 - Réactifs.

- Solution de sérualbumine bovine à 0,2 g.L⁻¹ notée « SAB » : 3 mL
- Réactif C : solution de coloration : en distributeur
- Réactif de Folin dilué au ½ : en distributeur
- Extrait de trypsine à doser noté « trypsine » : 1 mL
- Eau physiologique : 15 mL

1.3 - Protocole opératoire.**1.3.1 - Gamme d'étalonnage.**

Dans 5 tubes à essais, introduire de 0 à 1 mL de solution de SAB.

Compléter chaque tube à 1 mL avec de l'eau physiologique puis y ajouter 5 mL de réactif C.

Mélanger et laisser reposer 10 minutes.

Ajouter 0,5 mL de réactif de Folin dilué au ½ et mélanger.

Laisser se développer la coloration 30 minutes à l'obscurité avant de lire les absorbances à 650 nm contre le blanc réactif.

1.3.2 - Essais.

Réaliser 2 essais dans les mêmes conditions que l'étalonnage sur 1 mL d'extrait de trypsine à diluer au 1/250 en eau physiologique.

1.4 - Compte rendu et résultats.

Compléter la feuille de résultats jointe.

A l'aide de l'outil informatique, tracer le graphe $A_{650\text{ nm}} = f(\text{masse de protéines})$.

Préciser les points retenus, donner l'équation de la droite de régression ainsi que son coefficient de corrélation.

Déterminer la concentration massique en protéines de l'extrait enzymatique.

2 - Détermination de l'activité de la trypsine libre. (26 points)**2.1 - Principe.**

La vitesse initiale est déterminée par la méthode « 2 points ».

Le substrat utilisé, le L-BAPNA (N-benzoyl-arginyl-L-paranitroanilide), est solubilisé grâce à du DMSO (diméthylsulfoxyde). En présence de trypsine, il est hydrolysé en L-BA (N-benzoyl-L-arginine) et PNA (paranitroanilide). Ce dernier est un composé jaune qui absorbe fortement à 405 nm en milieu alcalin.

2.2 - Réactifs.

- L-BAPNA-DMSO à 0,025 mol.L⁻¹ noté « BAPNA » : 1,5 mL
- DMSO : 3,5 mL
- Tampon Tris 10 X noté « Tris 10X » : 2,5 mL
- Tampon Tris-DMSO noté « Tris-DMSO » : 2 mL
- Extrait de trypsine noté « trypsine » : 1 mL
- Formaldéhyde à 37% noté « formaldéhyde » : 1 mL

2.3 - Protocole opératoire.**2.3.1 - Préparation de la solution de travail.**

Introduire avant emploi, dans une fiole jaugée de 10 mL :

- 1 mL de L-BAPNA-DMSO,
- 3 mL de DMSO,
- 2 mL de tampon Tris 10 X.

Compléter au trait de jauge avec de l'eau distillée.

2.3.2 - Réalisation des 2 essais.

Introduire, dans 2 tubes à essai :

- 1,5 mL de solution de travail,
- 0,45 mL de tampon Tris-DMSO.

Préincuber 5 minutes au bain thermostaté à 30°C.

Ajouter 0,05 mL d'enzyme à diluer au 1/10 en eau physiologique et déclencher le chronomètre.

Arrêter la réaction après exactement 3 minutes par addition de 0,2 mL de formaldéhyde.

Lire les absorbances au spectrophotomètre à 405 nm contre un témoin réactif correctement réalisé.

2.4 - Compte rendu et résultats.

Compléter le tableau de résultats fourni.

Expliquer la réalisation du témoin réactif.

Déterminer la concentration d'activité de la trypsine libre en U par mL d'extrait enzymatique.

Calculer l'activité spécifique en U par mg de trypsine.

Données : 1 U = quantité d'enzyme permettant de transformer 1 micromole de substrat par minute dans les conditions opératoires.

$$\varepsilon_{\text{PNA}}_{405 \text{ nm}} = 11\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}.$$

3 - Détermination de l'activité de la trypsine immobilisée. (24 points)**3.1 - Principe.**

La trypsine est immobilisée dans un polymère d'alginate qui se forme au contact d'ions Ca²⁺. La vitesse initiale est déterminée en mettant en contact pendant 3 minutes le substrat avec la trypsine contenue dans les billes d'alginate.

3.2 - Réactifs.

Tube à hémolyse contenant 2,5 mL d'alginate à 1,5 % en surfusion noté « alginate ».

Solution de CaCl₂ à 2% notée « CaCl₂ » : 50 mL.

Bain de glace.

Extrait de trypsine noté « trypsine » : 1 mL.

3.3 - Immobilisation en billes d'alginate.

Introduire, dans le tube contenant l'alginate, 0,5 mL d'extrait de trypsine.

Mélanger soigneusement **sans faire de bulles** à l'aide d'une pipette Pasteur puis transférer le contenu dans le corps d'une seringue.

Laisser tomber le mélange goutte à goutte d'une hauteur de 20 cm environ dans un bécher plongeant dans un bain de glace et contenant environ 50 mL de CaCl_2 (veiller à ce que les gouttes ne tombent pas sur les billes néoformées).

Mélanger délicatement le contenu du bécher. Laisser réagir 20 minutes dans le CaCl_2 .

Récupérer les billes sur un filtre Büchner, les rincer à l'eau distillée et les compter.

Soit N le nombre de billes formées.

3.4 - Détermination de l'activité enzymatique immobilisée.

Suivre le même protocole que pour l'enzyme soluble mais en remplaçant l'extrait de trypsine libre par 8 billes contenant l'enzyme immobilisée (poser les billes sur la paroi du tube en position inclinée et déclencher le chronomètre après mélange).

Après avoir arrêté la réaction, transférer le surnageant dans des microcuvettes de lecture et procéder à la mesure des absorbances à 405 nm contre le témoin réactif.

Réaliser 2 essais.

3.5 - Compte rendu et résultats.

Compléter la feuille de résultats.

Déterminer la concentration d'activité de la trypsine immobilisée en U par mL d'enzyme soumise à immobilisation et l'activité spécifique en U par mg (ne pas tenir compte du volume de la phase solide dans les calculs).

Comparer les résultats obtenus pour les 2 formes de trypsine. Conclure.

Calculer le rendement d'immobilisation. Conclure.

NUMERO DE POSTE :**FEUILLE DE RÉSULTATS**
(À COMPLÉTER ET À RENDRE AVEC LA COPIE)**CONTRÔLE ET DEVELOPPEMENT**
EN INDUSTRIE AGROALIMENTAIRE**RELEVÉ DES VALEURS EXPERIMENTALES****1 - Dosage des protéines de l'extrait enzymatique.**

Tubes	1	2	3	4	5	E1	E2
Volume de SAB à 0,2 g.L ⁻¹ (mL)							
Volume de solution enzymatique au 1/250 (mL)							
Masse de protéines (mg/tube)							
A _{650 nm}							

2 - Détermination de l'activité enzymatique.

	Enzyme libre		Enzyme immobilisée	
	E1	E2	E1	E2
A (t = 3 min)				

N =

ÉPREUVE E5. UNITÉ U52**Réalisation pratique d'opérations techniques**

Au cours de l'épreuve, le jury appréciera les qualités d'organisation, la précision des gestes techniques, le respect des règles d'hygiène et de sécurité en laboratoire.

ÉTUDE D'UNE EAU DESTINÉE A LA CONSOMMATION HUMAINE**Durée : 3 H 30****BIOCHIMIE (75 points)**

On se propose de déterminer plusieurs caractéristiques d'une eau naturelle :

- l'alcalinité ;
- la teneur en azote ammoniacal ;
- la teneur en nitrates.

1 - Détermination de l'alcalinité.

D'après le décret n° 89-3 du 03.01.89, le pH d'une eau destinée à la consommation humaine doit être compris entre 6,5 et 9,0.

Pour l'alcalinité d'une eau, il n'existe pas de norme de potabilité mais sa mesure présente un intérêt pour évaluer le risque de corrosion et d'entartrage des réseaux d'adduction.

1.1 - Principe.

L'alcalinité d'une eau est déterminée par :

- son titre alcalimétrique (TA) qui mesure la teneur en hydroxydes et carbonates ;
- son titre alcalimétrique complet (TAC) qui mesure les teneurs en hydroxydes, carbonates et hydrogénocarbonates.

Ces déterminations se font par titrimétrie acido-basique en présence de phénolphtaléine (pour TA) et d'indicateur mixte (pour TAC).

1.2 - Réactifs.

- Eau à analyser ;
- solution d'acide chlorhydrique à environ 0,05 mol.L⁻¹ ;
- solution de phénolphtaléine ;
- indicateur mixte (rouge de méthyle, vert de bromocrésol) ;
- hydrogénocarbonate de potassium (KHCO₃) pur et anhydre.

1.3 - Protocole opératoire (2 essais).

- Dans une fiole d'Erlenmeyer placée sur fond blanc, introduire 100 mL d'eau à analyser et 2 gouttes de solution de phénolphtaléine :
 - si une coloration rose apparaît, verser la solution d'HCl à environ 0,05 mol.L⁻¹ jusqu'à décoloration (le pH est alors de l'ordre de 8,3). Soit V₁ le volume versé ;
 - si aucune coloration rose n'apparaît (pH < 8,3), le TA est nul et donc V₁ = 0.
- Dans la même fiole d'Erlenmeyer, ajouter 3 ou 4 gouttes d'indicateur mixte et, sans remettre la burette à zéro, verser la solution d'HCl jusqu'au virage de l'indicateur (un excès d'HCl conduit à une coloration rose saumon). Le pH est alors de 4,4. Soit V₂ le volume d'acide versé au total.

Faire relever toutes les chutes de burettes par un examinateur.

1.4 - Étalonnage de la solution d'HCl par pesée directe (2 essais).

Peser exactement une masse m d'hydrogénocarbonate de potassium (M = 100,11 g.mol⁻¹). Dissoudre dans l'eau distillée, ajouter 3 ou 4 gouttes d'indicateur mixte et verser la solution d'HCl jusqu'au virage de l'indicateur.

Effectuer une pesée en présence d'un examinateur.

Faire relever les chutes de burette par un examinateur.

1.5 - Compte rendu.

- Justifier l'ordre de grandeur des masses m pesées.
- Rassembler sous forme de tableau tous les volumes de chute de burette obtenus.
- Calculer la concentration de la solution d'HCl en mol.L^{-1} (CV : 1 %).
- Donner l'expression littérale puis calculer le titre alcalimétrique (TA) en degrés français.
- Donner l'expression littérale puis calculer le titre alcalimétrique complet (TAC) en degrés français.

Donnée : un degré français correspond à une alcalinité neutralisée par 0,2 millimole d'ions H^+ pour un litre d'eau.

2 - Détermination de la teneur en azote ammoniacal.

D'après le décret n° 89-3 du 03.01.89, la concentration en ammonium d'une eau potable doit être inférieure ou égale à 0,5 mg.L^{-1} .

2.1 - Principe.

L'azote ammoniacal est dosé par la technique de NESSLER (iodomercurate de potassium alcalin). Le réactif est décomposé avec formation de dimercuriammonium. Le phénomène peut être suivi spectrophotométriquement à 420 nm (formation d'un complexe jaune orangé).

2.2 - Réactifs.

- Eau à analyser ;
- solution étalon à 0,1 mg d'ammonium (NH_4^+) par mL ;
- NaOH à 30 % ;
- solution stock de NESSLER (TOXIQUE) ;
- réactif de NESSLER (en distributeur) : il a été préparé au moment de l'emploi de la façon suivante :
 - solution stock 10 mL,
 - NaOH à 30 % 5 mL,
 - eau distillée 5 mL.

2.3 - Protocole opératoire (2 essais notés D1 et D2).

- Gamme d'étalonnage.
Réaliser une gamme d'étalonnage de 6 tubes (témoin compris) de 0 à 50 μg d'ammonium par tube selon le protocole suivant :
 - x mL de solution étalon correctement diluée ($x \geq 1$ mL),
 - (10 - x) mL d'eau distillée,
 - 1 mL de réactif de Nessler.Homogénéiser et lire l'absorbance à 420 nm après 10 minutes d'attente.
- Essais.
Réaliser, dans les mêmes conditions que la gamme d'étalonnage, 2 essais (notés D₁ et D₂) sur 10 mL d'eau à analyser.

Faire relever les valeurs d'absorbance par un examinateur.

2.4 - Compte rendu.

Dresser le tableau de colorimétrie.

Exploiter les résultats expérimentaux à l'aide de l'outil informatique.

Calculer la concentration en ammonium de l'eau analysée en mg.L^{-1} . Le CV de la méthode est de 4 %.

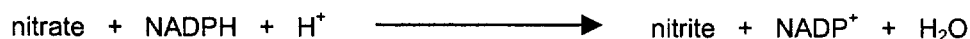
Conclure.

3 - Détermination de la teneur en nitrates.

Le décret n° 89-3 du 03.01.89 fixe la concentration limite à 50 mg.L^{-1} pour les eaux de consommation humaine.

3.1 - Principe.

Les nitrates sont réduits en nitrites par le NADPH, H^+ en présence de la nitrate réductase (NR) à pH 7,8 selon la réaction :



La consommation de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ est mesurée par diminution de l'absorbance à 340 nm.

3.2 - Réactifs.

- Eau à analyser ;
- mélange réactionnel (tampon pH 7,8, NADPH, stabilisateurs) ;
- solution de nitrate réductase (NR).

3.3 - Protocole opératoire (2 essais).

Les conditions de mesure sont les suivantes :

- température ambiante,
- cuve de spectrophotomètre de 1 cm de trajet optique ,
- longueur d'onde : 340 nm,
- lecture contre l'air.

Procéder comme indiqué dans le tableau suivant :

	Témoin	Essai
Mélange réactionnel (mL)	1,00	1,00
Échantillon (mL)	---	1,00
Eau distillée (mL)	2,00	1,00
Mélanger. Après 3 minutes environ, lire les absorbances A_1 des solutions. Déclencher la réaction par addition de :		
Solution de NR (mL)	0,05	0,05
Mélanger. Après exactement 40 minutes, lire les absorbances A_2 des solutions. Après 20 minutes exactement, lire à nouveau les absorbances A_3 des solutions.		
Traiter les absorbances du témoin et des essais comme suit : $\Delta A \text{ témoin} = (A_1 - A_2) \text{ témoin} - 2 \cdot (A_2 - A_3) \text{ témoin}$ $\Delta A \text{ essai} = (A_1 - A_2) \text{ essai} - 2 \cdot (A_2 - A_3) \text{ essai}$ Soustraire la différence d'absorbance du témoin de la différence d'absorbance des essais : $\Delta A = \Delta A \text{ essai} - \Delta A \text{ témoin}$		

3.4 - Compte rendu.

- Rassembler dans un tableau toutes les valeurs d'absorbance lues.
- Etablir la concentration en nitrate de l'eau analysée en g.L^{-1} et la calculer. Le CV de la méthode est de 6 %.
- Conclure.

Données :

- Masse molaire des nitrates = 62 g.mol^{-1} .
- $\epsilon_{\text{NADPH, H}^+}$ à 340 nm = $6300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.