

BREVET DE TECHNICIEN SUPÉRIEUR BIOANALYSES ET CONTRÔLES

Épreuve E5 - Unité U51

Techniques de biochimie

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

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

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U51
Techniques de biochimie

ANALYSES EN AMYLO-GLUCOSERIE

L'hydrolyse enzymatique totale de l'amidon permet d'obtenir des sirops de glucose.

Des dosages chimiques fondés sur les propriétés réductrices des sucres libérés par hydrolyse de l'amidon restent d'actualité dans les bioindustries de l'amidon. L'activité catalytique des préparations amyliques est mesurable à l'aide de l'utilisation de substrats synthétiques libérant un chromogène après hydrolyse.

Le sujet proposé comprend deux parties :

- Recherche d'effets de matrice lors du dosage des sucres réducteurs par la méthode au 3,5-dinitrosalicylate.
- Dosage de l'activité d'une préparation d'amylase.

I - RECHERCHE D'EFFETS DE MATRICE. (53 points)

L'étude proposée est une recherche d'effets de matrice. Il faut démontrer que les effets de matrices sont non significatifs pour le type d'échantillons à mesurer. Il s'agit ainsi de retrouver de façon significative le glucose ajouté sur des échantillons analysés avant et après ajout.

On appelle matrice l'ensemble des constituants présents dans un échantillon autres que la substance dosée appelée « analyte ».

La méthode étudiée est un dosage des sucres réducteurs au 3,5-dinitrosalicylate (3,5-DNS). Elle est utilisée pour mesurer la concentration en équivalent glucose dans des hydrolysats enzymatiques d'amidon (en toute rigueur, on mesure un pouvoir réducteur exprimé en équivalent glucose).

I.1 - Réaction colorée.

I.1.1 – Principe.

Le 3,5-DNS réagit avec les sucres réducteurs en donnant un produit coloré quantifiable par photométrie à 530 nm.

I.1.2 - Protocole opératoire.

Conditions opératoires

La réaction de la méthode au 3,5-DNS est complexe. Pour que les résultats soient reproductibles, le candidat veillera :

- à placer ses tubes dans un bain marie à ébullition soutenue, avec un niveau d'eau dépassant le niveau de liquide dans les tubes ;
- à mesurer le temps avec précision et respecter une température d'incubation de 100°C. ;
- à refroidir immédiatement les tubes réactionnels après leur sortie du bain marie, dans un bain d'eau à 0-4°C.

Lorsque ces conditions sont respectées, les tubes de gamme et les essais peuvent être réalisés indépendamment. La coloration est stable une heure.

Réalisation du dosage

Dans chaque tube à essais, introduire :

- 1,000 mL de solution glucosée (étalons ou solutions E).
- Ajouter 1,5 mL de réactif au 3,5-DNS dans chaque tube.
- Boucher les tubes avec du papier d'aluminium et les porter à **100°C** (bain d'eau en ébullition) pendant **5 minutes exactement**. Refroidir dans un bain d'eau à 0-4°C. Après refroidissement, ajouter 7,5 mL d'eau déminéralisée.
- Lire l'absorbance à 530 nm **contre de l'eau**.

Relever les absorbances en présence d'un examinateur.

I. 2 - Étalonnage. (26 points)**I.2.1 - Réactifs et matériel :**

- Glucose pur anhydre (près des balances).
- Réactif au 3,5-DNS en distributeur réglé à 1,5 mL.
- Eau déminéralisée en distributeur réglé à 7,5 mL.
- 6 tubes à essais.
- 1 fiole jaugée de 200 mL.
- 7 cuves pour photométrie visible.
- 1 chronomètre

I.2.2 - Protocole opératoire.Préparation de la solution étalon

Préparer par pesée exacte de glucose pur et anhydre (balance au 1/10 de mg) 200 mL (en fiole jaugée) de solution étalon de glucose à 1 g/L exactement (précision 0,1 %).

Réaliser la pesée en présence d'un examinateur.

Étalonnage

Dans une série de 6 tubes à essai, introduire : 0 ; 0,200 ; 0,400 ; 0,600 ; 0,800 et 1,000 mL respectivement de solution de glucose à 1 g.L⁻¹.

Compléter à 1,000 mL avec de l'eau déminéralisée.

Réaliser l'étalonnage selon le **protocole opératoire présenté en I.1.2.**

I.2.3 - Compte rendu.

Rassembler les résultats en complétant le tableau étalonnage de l'annexe 1.

À l'aide d'un logiciel informatique, tracer le graphique de la fonction d'étalonnage $\Delta A = f(Q)$ en utilisant un modèle linéaire et donner les paramètres de cette fonction (coefficient directeur et ordonnée à l'origine).

I.3 - Étude d'effets de matrice. (27 points)**I.3.1 - Réactifs et matériel :**

- 10 solutions E_{1,0} à E_{5,1}.
- réactif au 3,5-DNS en distributeur réglé à 1,5 mL.
- Eau déminéralisée en distributeur réglé à 7,5 mL.
- 10 tubes à essai.
- 11 cuves pour photométrie visible.

I.3.2 - Principe de l'étude.

On dose l'équivalent glucose de chaque échantillon par la méthode au 3,5-DNS sur 1,000 mL d'échantillon dans exactement les mêmes conditions que l'étalonnage.

Pour l'étude d'effets de matrice, il faut effectuer des ajouts dosés de glucose à des échantillons E_i. Chaque échantillon est analysé sans ajout (solution E_{i,0}) et avec ajout (solution E_{i,1}).

10 solutions, dont la composition est donnée dans le tableau ci-dessous, sont ainsi disponibles.

	Composition
Solution E _{1,0}	Échantillon E ₁ brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{1,1}	Échantillon E ₁ auquel on a ajouté 0,15 mg/mL de glucose exactement
Solution E _{2,0}	Échantillon E ₂ brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{2,1}	Échantillon E ₂ auquel on a ajouté 0,20 mg/mL de glucose exactement
Solution E _{3,0}	Échantillon E ₃ brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{3,1}	Échantillon E ₃ auquel on a ajouté 0,30 mg/mL de glucose exactement
Solution E _{4,0}	Échantillon E ₄ brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{4,1}	Échantillon E ₄ auquel on a ajouté 0,40 mg/mL de glucose exactement
Solution E _{5,0}	Échantillon E ₅ brut (pas d'ajout réalisé)
Solution E _{5,1}	Échantillon E ₅ auquel on a ajouté 0,50 mg/mL de glucose exactement

I.3.3 - Protocole opératoire.

Dans une série de 10 tubes à essai, introduire 1,000 mL de chacune des 10 solutions $E_{1,0}$ à $E_{5,1}$. Doser les sucres réducteurs par la méthode au 3,5-DNS selon le protocole opératoire présenté en I.1.2.

I.3.4 - Résultats et analyse graphique.

Rassembler les résultats expérimentaux dans le tableau 1 (étude d'effets de matrice) de l'annexe 1.

En dosant les solutions $E_{i,0}$ on obtient la quantité d'équivalent glucose dans 1 mL de chaque échantillon E_i sans ajout. Soit x_i ces valeurs.

En dosant les solutions $E_{i,1}$ on obtient la quantité d'équivalent glucose dans 1 mL de chaque échantillon E_i après l'ajout de glucose. Soit w_i ces dernières valeurs.

Soit $r_i = w_i - x_i$ quantité ajoutée retrouvée expérimentalement.

Pour chaque échantillon, on connaît v_i , la quantité de glucose ajoutée par pesée à chaque fraction de 1 mL d'échantillon E_i pour réaliser les solutions $E_{i,1}$ (voir tableau page 2/6).

Compléter le tableau 2 de l'annexe 1.

Soit l'ensemble des points de coordonnées $(v_i; r_i)$. On peut construire la droite de régression, appelée « droite de recouvrement », d'équation $r = C_0 + C_1 v$ qui passe parmi les points.

Si la pente C_1 de cette droite est statistiquement équivalente à 1 et son ordonnée à l'origine C_0 statistiquement équivalente à 0, on peut conclure à l'absence d'effets de matrice.

À l'aide d'un logiciel informatique :

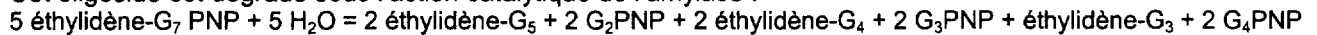
- tracer la droite de recouvrement ;
- déterminer la pente C_1 de cette droite et son ordonnée à l'origine C_0 .

Commenter les résultats obtenus.

II - DOSAGE DE L'AMYLASE. (27 points)**II.1 - Principe.**

L'hydrolyse de l'amidon peut être catalysée par des amylases. L'activité d'un lot d'amylase est mesurée par son action sur un substrat synthétique : l'éthylidène-4,6(G₇)-p-nitrophényl(G₁)-αD-maltoheptaose.

Cet oligoside est dégradé sous l'action catalytique de l'amylase :



Les fragments G_2 PNP, G_3 PNP et G_4 PNP qui en résultent sont complètement hydrolysés par l'α-glucosidase en p-nitrophénol et glucose.



(PNP = p-nitrophénol ; G = glucose)

L'intensité de la coloration développée, liée à l'apparition du PNP, est directement proportionnelle à l'activité de l'amylase et est mesurée par photométrie à 405 nm.

II.2 - Réactifs et matériels :

- Réactif R1 : tampon/enzyme. 4 mL
Tampon HEPES 52,5 mmol/L, pH 7,15 ; chlorure de sodium: 87 mmol/L ; chlorure de magnésium : 12,6 mmol/L ; chlorure de calcium : 0,075 mmol/L ; α-glucosidase 4 kU/L ; conservateur
- Réactif R2 : tampon/substrat. 4 mL. À conserver à + 4° C.
Tampon HEPES 52,5 mmol/L, pH 7,15 ; éthylidène-4,6(G₇)-p-nitrophényl(G₁)-αD-maltoheptaose 22 mmol/L ; conservateur.
- Réactif d'arrêt alcalin : NaOH 2 mol/L. 4 mL (CORROSIF).
- Eau physiologique : 15 mL.
- Solution d'amylase à diluer extemporanément au 1/20 en eau physiologique. 0,8 mL. À conserver à + 4° C.
- 3 cuves pour photométrie visible
- 1 fiole jaugée de 10 mL.
- 1 chronomètre.

II.3 - Protocole opératoire. (2 essais)

Dans un tube à hémolyse verser :

Réactif R1 : 1 mL

Réactif R2 : 0,9 mL

Homogénéiser ; préincuber à 30 °C environ 5 minutes.

Ajouter 0,1 mL d'amylase diluée ; après 3 min arrêter la réaction par ajout de 1 mL de réactif d'arrêt alcalin.

Réaliser les manipulations en présence d'un examinateur.

Lire les absorbances à 405 nm contre un blanc, la coloration est stable 15 minutes.

II.4 - Compte rendu et résultats.

Compléter le tableau de résultats fourni.

Décrire la réalisation du blanc.

Établir l'expression littérale du calcul de la concentration catalytique en U par mL d'enzyme non diluée.

Déterminer pour chaque essai, la concentration d'activité catalytique de la préparation d'amylase en U par mL d'enzyme non diluée sachant que 1 unité d'amylase est définie comme la quantité d'enzyme catalysant la libération d'une micromole de PNP par minute dans les conditions opératoires.

$$\epsilon_{\text{PNP}} = 17\,500 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \text{ à } \lambda = 405 \text{ nm}$$

Valider le dosage selon le plan d'acceptabilité des résultats fourni dans l'annexe 2. Ainsi, après avoir dosé l'échantillon amylase deux fois (en conditions de répétabilité), appliquer le protocole de validation fourni en annexe 2 puis, en fonction de l'écart entre les 2 résultats, conclure sur le résultat final ou la nécessité de réaliser un essai supplémentaire.

Données :

Données : l'écart-type de répétabilité est constant sur le domaine des mesures et est égal, à 0,2 U. mL⁻¹ d'enzyme non diluée.

Annexe 1Relevé de valeurs expérimentales et calculs intermédiaires**I - Recherche d'effets de matrice.**Étalonnage

Tubes	Témoin réactif	1	2	3	4	5
volume d'étalon glucose à 1 g/L en mL	0	0,200	0,400	0,600	0,800	1,000
Q = Quantité de glucose en mg	0					
Absorbance contre l'eau ($\lambda = 530$ nm)						
ΔA = Absorbance diminuée de l'absorbance du témoin réactifs	0					

Étude d'effets de matrice**Tableau 1**

	Absorbance contre l'eau ($\lambda = 530$ nm)	Absorbance diminuée de l'absorbance du témoin réactif (ΔA)	Quantité de glucose, en mg, mesurée dans 1 mL (*)
Solution E _{1,0}			X ₁ =
Solution E _{1,1}			W ₁ =
Solution E _{2,0}			X ₂ =
Solution E _{2,1}			W ₂ =
Solution E _{3,0}			X ₃ =
Solution E _{3,1}			W ₃ =
Solution E _{4,0}			X ₄ =
Solution E _{4,1}			W ₄ =
Solution E _{5,0}			X ₅ =
Solution E _{5,1}			W ₅ =

Tableau 2

	x _i (*) en mg dans 1 mL d'échantillon	v _i (*) en mg dans 1 mL d'échantillon	w _i (*) en mg dans 1 mL d'échantillon	r _i = w _i - x _i (*) en mg dans 1 mL d'échantillon
Échantillon E ₁		0,15		
Échantillon E ₂		0,20		
Échantillon E ₃		0,30		
Échantillon E ₄		0,40		
Échantillon E ₅		0,50		

Notes (*):

Les résultats de x_i, v_i, w_i, r_i seront donnés avec 4 chiffres significatifs dans le tableau ci-dessus.**II - Dosage de l'amylase.**

	Essai 1	Essai 2
Abs à 405 nm à t = 3 min		

Annexe 2

Acceptabilité des résultats d'essais D'après la norme ISO 5725-6 :1994(F)

Plan à 2 résultats obtenus pour débiter et troisième résultat supplémentaire éventuellement déterminé (en conditions de répétabilité).

$CR_{(2)}$ = conditions de répétabilité pour 2 essais.

$CR_{(3)}$ = conditions de répétabilité pour 3 essais.

La différence absolue entre les deux résultats doit être comparée à la limite $CR_{(2)} = 2,8 \sigma_r$. Où σ_r est l'écart type de répétabilité.

En effet, pour une distribution normale, l'étendue critique au niveau de probabilité 95% de la différence entre deux résultats est de 2,8 fois l'écart-type.

Si la différence absolue entre les deux résultats ne dépasse pas $CR_{(2)}$ alors les deux résultats sont considérés acceptables, il convient de donner comme résultat final établi la moyenne arithmétique des deux résultats.

Si la différence absolue entre les deux résultats dépasse $CR_{(2)}$ il convient d'obtenir un troisième résultat.

L'étendue des trois résultats ($X_{\max} - X_{\min}$) doit être comparée à la limite $CR_{(3)} = 3,3 \sigma_r$. Où σ_r est l'écart type de répétabilité, X_{\max} et X_{\min} le plus grand et le plus petit des résultats respectivement.

En effet, pour une distribution normale, l'étendue critique au niveau de probabilité 95% de la différence entre le plus grand et le plus petit parmi trois résultats est de 3,3 fois l'écart-type.

Si l'étendue des 3 résultats ne dépasse pas $CR_{(3)}$ il convient de donner comme résultat final établi la moyenne arithmétique des trois résultats.

Si l'étendue des trois résultats est supérieure à la limite $CR_{(3)}$ il convient de donner comme résultat final établi la médiane des trois résultats soit le résultat médian.