

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.

Documents interdits - Calculatrice autorisée

ÉPREUVE E5. UNITÉ U51
Techniques de biochimie

CONTRÔLE D'UN « MIX » DESTINÉ À LA FABRICATION DE PAIN

Le pain est essentiellement constitué de farine de froment, de sel, de levure et d'eau. Cependant l'addition de certains composés est autorisée afin de pallier les déficiences des farines ou d'améliorer la panification. Parmi les auxiliaires de fabrication utilisés, on trouve notamment l'acide ascorbique ou vitamine C et des amylases.

On se propose de réaliser des contrôles dans un « mix » destiné à la fabrication de pain, mélange composé de farine de froment, d'auxiliaires de fabrication et d'additifs :

- extraction et dosage des gliadines,
- détermination de la teneur en acide ascorbique (E 300),
- détermination de l'activité d'une enzyme : l' α -amylase.

1 - Extraction et dosage des gliadines. (37 points)

Les gliadines, protéines du froment, présentent un polymorphisme variétal important, ce qui permet l'identification ou la vérification de la pureté d'une matière première.

La première étape de l'analyse intègre l'extraction et le dosage.

1.1 - Premier temps d'extraction (déjà réalisé) :

Le premier temps d'extraction a été menée de la façon suivante :

Pesée exacte de 1,50 g de mix dans un tube à centrifuger.

Ajout de 10 mL de solution aqueuse d'éthanol à 40 % (v/v).

Homogénéisation 4 fois 30 secondes au vortex.

Centrifugation 10 minutes à 3 000 g .

Une fraction du surnageant a été prélevée et transférée dans un microtube à centrifuger.

Ce surnageant S est fourni pour réaliser la suite de l'extraction.

1.2 - Deuxième temps d'extraction des gliadines :

1.2.1 - Objectif

Une deuxième extraction est nécessaire afin de purifier la phase éthanolique. La concentration finale de 70 % en éthanol permet le dosage des protéines par la méthode du biuret.

1.2.2 - Matériel et réactifs

- Surnageant noté « S » en microtube à centrifuger (1 mL).
- Ethanol à 95 % (v/v) en microtube (1 mL).
- Microtubes type Eppendorf.

1.2.3 - Protocole opératoire

Transférer 0,500 mL du surnageant S fourni dans un microtube.

Ajouter 0,600 mL d'éthanol à 95 % (v/v), volume nécessaire pour amener la concentration à 70 % (v/v) en éthanol.

Homogénéiser au vortex.

Laisser 15 minutes à température ambiante.

Centrifuger 5 minutes en microcentrifugeuse à 9 000 g.

Prélever le surnageant S_p pour le dosage des protéines.

1.3 - Dosage des protéines : méthode du biuret :

1.3.1 - Matériel et réactifs

- solution étalon de SAB à 5 mg.mL⁻¹ en eau physiologique (1 mL),
- solution contrôle à exactement 2,00 g.L⁻¹ notée « P_{cont} » (0.5 mL),
- eau physiologique (2 mL),
- réactif de Gornall (en distributeur),
- 8 microcuves.

1.3.2 - Protocole opératoire

A partir d'une solution étalon de séralbumine bovine (SAB) à 5 mg.mL^{-1} , réaliser en microcuvettes une gamme d'étalonnage de 0,25 à 1 mg par cuvette, en eau physiologique, sous un volume de $200 \mu\text{L}$.

Ajouter 1 mL de réactif cuproalcalin de Gornall. Homogénéiser.

Laisser développer la coloration 20 minutes à l'obscurité puis mesurer l'absorbance à 540 nm contre un témoin convenable.

Réaliser 2 essais sur $100 \mu\text{L}$ du surnageant S_p .

Effectuer un contrôle du dosage à l'aide de la solution P_{cont} à exactement $2,00 \text{ g.L}^{-1}$.

Relever les absorbances en présence d'un examinateur.

1.4 - Compte-rendu :

Justifier le volume d'éthanol à 95% ajouté.

Expliquer pourquoi dans les protocoles de centrifugation, il est préférable d'exprimer la vitesse en nombre de g plutôt qu'en nombre de tours par minute.

Exploitation des résultats :

Compléter la feuille de résultats.

Présenter un tableau complet du dosage des protéines.

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

Analyser le résultat du contrôle.

Calculer la concentration en protéines du surnageant S_p .

Donnée : coefficient de variation du dosage = 1,5 %.

2 - Dosage de l'acide ascorbique sur un extrait « C » purifié. (21 points)

L'extraction de la vitamine C a été menée de la façon suivante :

Broyage de 200 g de « mix » dans 50 mL d'acide métaphosphorique à 0,4 %.

Filtration sur membrane d'acétate de cellulose ($0,2 \mu\text{m}$).

Chromatographie préparative sur cartouche SEP PAK C 18.

L'extrait C obtenu a été recueilli en fiole jaugée et ajusté à 50 mL pour l'analyse.

Cet extrait C est fourni pour réaliser le dosage.

2.1 - Réactifs :

- « Extrait C » (20 mL) ,
- Solution de DCPIP à $1,50 \text{ mmol.L}^{-1}$ (60 mL) ,
- Eau distillée bouillie refroidie (50 mL).

2.2 - Principe du dosage :

Le principe du dosage est basé sur les propriétés réductrices de l'acide ascorbique.

L'oxydant utilisé est le 2,6 dichlorophénol-indophénol (DCPIP) fourni à $1,50 \text{ mmol.L}^{-1}$.

1 mole de DCPIP oxyde 1 mole d'acide ascorbique.

2.3 - Protocole opératoire (2 essais) :

Introduire dans une fiole d'Erlenmeyer :

- E = 5,00 mL de l'extrait C,
- 15 mL d'eau distillée bouillie et refroidie.

Verser la solution de DCPIP jusqu'à l'apparition d'une couleur rose pâle persistant pendant 30 secondes.

Appeler un examinateur pour relever chaque chute de burette.

2.4 - Compte rendu :

Compléter la feuille de résultats.

Calculer la concentration massique en vitamine C de l'extrait C.

Calculer la teneur du mix en acide ascorbique en mg pour 100 g.

On admettra que le rendement de l'extraction est de 100 %.

Conclure.

Données : $M_{\text{vitamine C}} = 176,13 \text{ g.mol}^{-1}$.

Le coefficient de variation du dosage = 0,5 %.

La teneur maximale de vitamine C conseillée dans le mix est de 300 mg.kg^{-1} .

3 - Dosage de l' α -amylase sur un extrait « A » purifié. (22 points)**3.1 - Principe :**

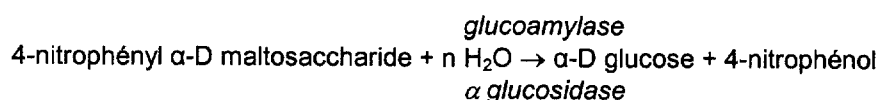
Le substrat utilisé est le 4-nitrophényl α -D maltoheptaoside 4,6 o-éthylidène dérivé du maltoheptaoside, sur lequel sont branchés :

- une molécule de 4-nitrophénol,
- un réactif bloquant les fonctions hydroxyles libres en position 4 et 6.

La réaction principale catalysée par l' α -amylase est la suivante:



Puis le 4-nitrophényl α -D maltosaccharide est hydrolysé en présence de la glucoamylase et de l' α -glucosidase selon la réaction globale suivante:



L'ensemble du processus réactionnel est bloqué par addition de trizmabase. On mesure le 4-nitrophénol formé par spectrophotométrie à 410 nm.

3.2 - Réactifs :

- « mélange pré réactionnel » (8 mL) ;
- extrait amyliasique noté « A » (100 μ L) à conserver dans la glace ;
- trizmabase (3 mL).

3.3 - Protocole opératoire (2 essais) :

Réaliser l'ensemble de la manipulation en présence d'un examinateur.

Préincuber en tube à hémolyse 2 mL de mélange pré réactionnel (substrat + α -glucosidase + glucoamylase).

Déclencher la réaction par ajout de 0,020 mL de « A ».

Après 10 minutes exactement à 40°C arrêter la réaction par addition de 0,7 mL de trizmabase.

Mesurer l'absorbance à 410 nm contre un témoin adéquat.

3.4 - Compte rendu :

Quelle est la méthode enzymatique utilisée pour cette détermination ?

Compléter la feuille de résultats.

Donner la composition quantitative du témoin.

Etablir la formule littérale permettant de calculer la concentration d'activité catalytique de l'extrait α -amylase en U.mL⁻¹.

Effectuer l'application numérique.

Données : - $\epsilon_{410\text{nm}}^{4\text{-nitrophénol}} = 1800 \text{ m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

- 1 U correspond à la quantité d'enzyme libérant 1 μ mol de 4-nitrophénol par minute.

- Le coefficient de variation du dosage = 2,5 %.

Feuille de résultat

poste n°

I- Extraction et dosage des gliadines.

Résultats du dosage des protéines par la méthode du biuret :

Masse de protéine / cuve en mg	Gamme d'étalonnage					essais		contrôle
A _{540 nm}								

II- Dosage de l'acide ascorbique sur un extrait « C » purifié.

Essai	1	2
V _{eq} en mL		

III- Dosage de l'α-amylase sur un extrait « A » purifié.

Essai	1	2
ΔA _{410 nm} en 10 minutes		