

Travaux pratique de biochimie de 2^o année tronc commun LMD résolus

<u>Note :</u>	<u>Observation :</u>

Réaliser par :

❖ Mghozzi omar el mokhtar

❖ Aimeur Ahmed

Groupe : 19.

Sous-groupe : 01.

Année scolaire :2012/2013

TP n°1 : Structure des Aldoses

Fiche technique du TP :

But du TP :

- connaître les structures des sucres (des aldoses).
- construire des modèles des différentes molécules (des glycérols).
- appliquer et connaître la convention de Fisher et représentation.
- énantiomorphes et stéréoisomères.
- cyclisation.
- anomérisation.
- stabilité de la conformation spatiale des oses.

Principe du TP :

- former à l'œil et à mesure les différentes molécules des aldoses.
- Appliquer la représentation de Fisher et bien connaître la convention.
- Bien connaître le principe des énantiomères et stéréoisomères.
- Cyclisation et notion d'anomérisation.
- Anomérisation : conséquence de l'existence du nouveau centre asymétrique.
- Forme chaise et bateau : la plus stable ?

Matériels utilisés :

- boîtes à outils des petites boules pour faire former les différentes molécules d'Aldoses.
- papier blanc.

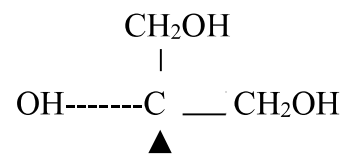
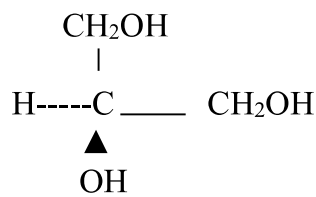
1.

- a) la construction de la molécule de Glycérol $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$.
- b) Oui, les deux modèles sont superposables .

-oui, il existe deux isomères du glycérol.

-oui, les molécules de glycérol contiennent un C asymétrique.

c)



H

2.

a)- ne pas démonter les 2 modèles et construire un modèle de la molécule de glycéraldéhyde $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CHO}$.

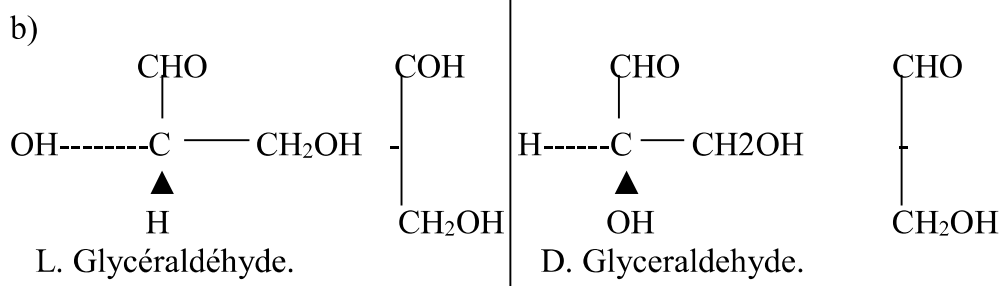
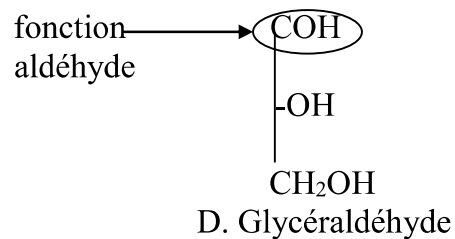
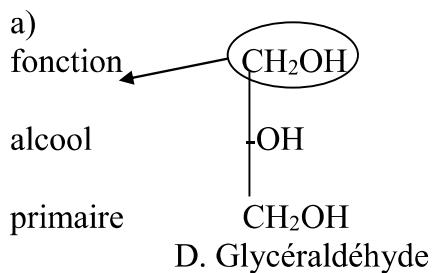
b) oui, cette molécule de triose contient un C asymétrique c'est le C_2 .

c) construire un nouveau modèle de la molécule du glycéraldéhyde.

d) oui, les deux molécules sont superposables.

e) oui, les deux molécules de L ,D glycéraldéhyde sont image l'une de l'autre dans un miroir.

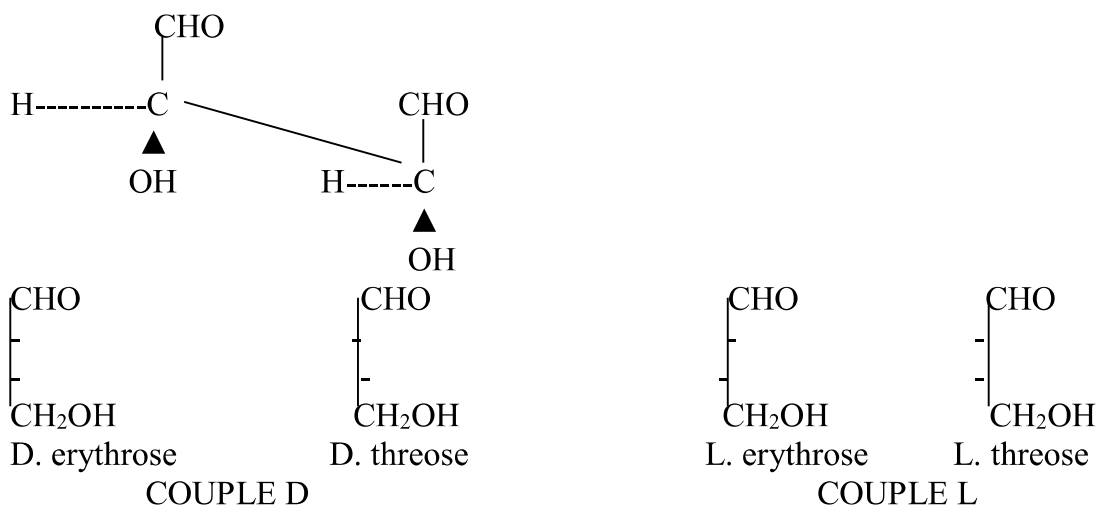
3.



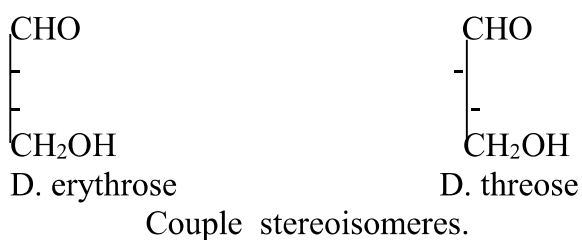
4.

- transformation de la molécule de L. glycéraldéhyde en un 2^{ème} molécule de D. glycéraldéhyde.
- L'obtention d'une molécule de tetrose.
- Le tetrose contient 4 atomes de C.
- La molécule de tetrose contient 2 C asymétyques.
- C₂ et C₃.
- Isomères de tetrose : $2^n / 2^2 = 4$ isomères.
- On obtient 2 isomères de tetrose en partant du D. Glycéraldéhyde.

Enantiomorphes et stereoisomeres :



Couple enantiomorphes:



5.

- oui, on arrive à rendre les 2 molécules superposables.
- nommez tout les isomères de tetrose.

6.

c) on a 3 C asymétrique que la molécule de pentose contenait.

d) c'est le C₂, C₃, et C₄.

e) en partant du D. glycéraldéhyde on obtient : $2^3 = 8$ donc 4D et 4L

7.

a) on a 4 C asymétrique que la molécule d'hexose contient.

b) elles sont C₂, C₃, C₄, et C₅.

c) on obtient : $2^{n-1} = 8$ isomères en partant du D.glycéraldéhyde.

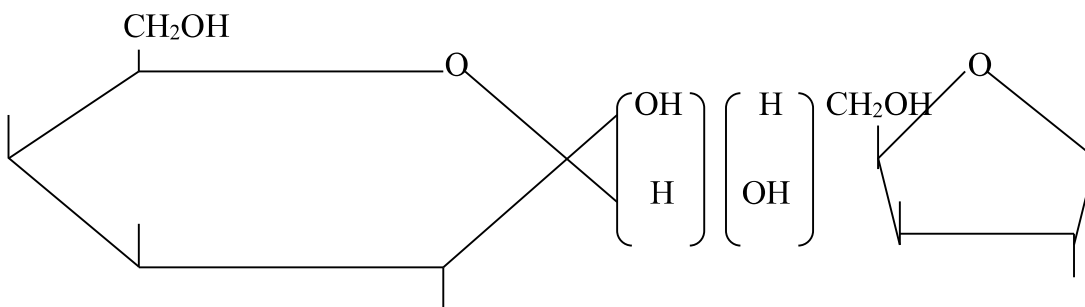
- $2^{n-2} = 12$ isomères en partant de D. erythrose.

- $2^{n-2} = 12$ isomères en partant du D. arabinose.

- $2^{n-2} = 12$ isomères en partant du D. ribose.

8. Cyclisation:

a)



b) Anomerie :

- oui on arrive à pivoter le OH du C anomérique vers le haut \longrightarrow α hexose pyranoaldéhyde.

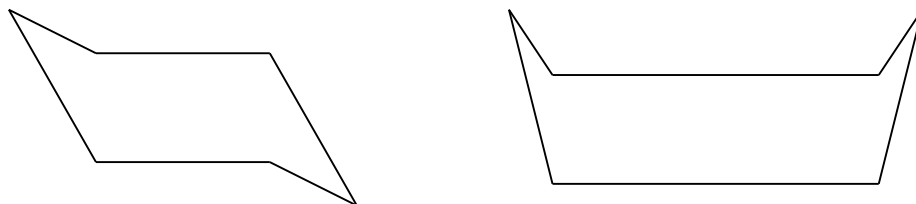
- oui on arrive à orienter le OH de C₁ vers le bas.

- on obtient un β -hexosepyranoaldéhyde « phénomène de mutarotation ».

- oui, c'est une des caractéristiques des oses cyclique.

- c'est une caractéristique propre aux oses cycliques.

d) stabilité de la conformation spatiale des oses :



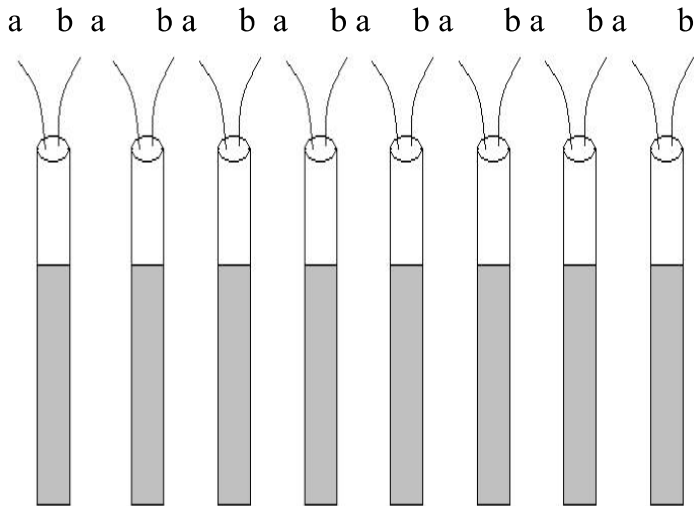
-bateau-

- 8 tubes d'expérience, bain marie, corbeille en metalle pour superposer les tubes.

- le but de ce TP c'est identifier un sucre inconnu à partir d'une chaîne de réactions chimiques spécifiques.
- Son principe est un principe chimique parce que l'identification d'un sucre se base sur la présence de produits et réactifs chimiques

1) les étapes d'expérience :

a) 1^{ère} réaction : réaction Fehling :



0,5ml 0,5ml 0,5ml 0,5ml 0,5ml 0,5ml 0,5ml 0,5ml
ARA GLU GALA RIB FRUC SACC X EAU

Solution de Fehling A }
Solution de Fehling B } 0,5 ml.

-recherche du pouvoir réducteur à la liqueur de Fehling (A et B).

-le pouvoir est mise en évidence en réduisant une solution .

$\left[\text{Cu So}_4 \right] \text{ A} \longrightarrow \text{sulfate de cuivre.}$

$\text{B} \longrightarrow \text{tétrahydroxyde de K}_4\text{Na}$

- on a placé les tubes dans un panier puis on les a mis dans un bain marie, on les retient des que leur contenu commence à bouiller.

b) 2^{ème} réaction : réaction selivanoff (spécifique aux cétooses) :

- identifier les cétooses.
- On rajout la solution selivanoff à tout les solutions et on les mets dans un bain marie pendant 3 minutes.

d) 3^{ème} réaction : Réaction à l'ortho-toludine :

- mise en évidence des aldoses.

- On rajoutant cette solution sur toutes les solutions précédentes et on les met dans un bain marie pendant 5 minutes.

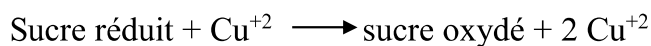
e) 4^{ème} réaction : Réaction de la glucose-oxydase :

- en versant quelques gouttes du sucre inconnu sur un propre de la paille.

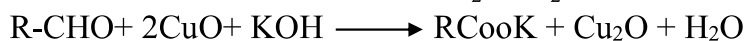
Résultat :

1^{ère} réaction :

	Ara	Glu	Gal	Rib	Fruc	Sacc	X	Eau
Fehling	+	+	+	+	+	-	+	-



Donc on aura :



(Bleu)

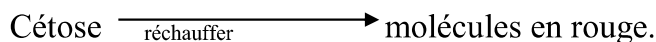
(Rouge brique)

Rq: si l'on fait réchauffer la solution de plus le saccharose va devenir glucose et fructose.

2^{ème} réaction :

	Ara	Glu	Gal	Rib	Fruc	Sacc	X	Eau
Seliwanoff	-	-	-	-	+	-	-	-

- la couleur n'as pas changé pour toutes les réactions sauf le Fructose puisqu'il a une fonction cétonique.



- si l'on réchauffe plus le saccharose devient glucose et Fructose \longrightarrow rouge brique.

\Rightarrow X n'est pas un cétose.

3^{ème} réaction :

	Ara	Glu	Gal	Rib	Fruc	Sacc	X	Eau
Ortho-toludine	Rouge	Vert	Vert	Rouge	Vert	X	Vert	?

-changement de couleur des différents réactions après l'ajout de l'ortho-toludine.

- aldose $\xrightarrow{\text{réchauffement+acide acétique}}$ base de schiff.

- aldose (pentose) $\xrightarrow{\text{ortho-toludine}}$ couleur jaune orange.

- aldose (hexose) $\xrightarrow{\text{ortho-toludine}}$ couleur verte.

\Rightarrow X aldohexose.

4 éme réaction :

	Ara	Glu	Gal	Rib	Fruc	Sacc	X	Eau
Glucose-oxydase	-	+	-	-	-	-	-	-

- la réaction est positive avec le glucose (bleu vert) selon cette réaction :
Glucose $\xrightarrow{\text{glucoxydase}}$ acide- gluconique (bleu-vert) + H₂O

Conclusion :

	Fehling	seliwanoff	Ortho-toludine	Glucose oxydae
X sucre	+	-	+ vert foncé	-

D'après les résultats obtenus on considère que le sucre inconnu est le glucose (aldéhyde, hexose, réducteur).

TP n°3 : Détermination de l'indice d'acidité d'un triglycéride

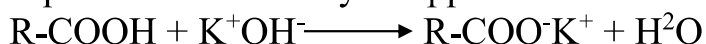
Fiche technique du TP :

But du TP :

Déterminer et calculer l'indice d'acidité.

Principe du TP :

- dans une matière grasse, l'acidité résulte uniquement de la présence de carboxyles appartenant à des acides gras.



Le dosage peut être direct; une masse m de corps gras est dissoute dans un mélange éthanol-éther préalablement neutralisé par la potasse alcoolique, en présence de phénol phtaléine. L'acidité libre est dosée par la potasse alcoolique titrée. En présence de phénol phtaléine cette méthode présente l'inconvénient de placer la potasse alcoolique dans la burette.

Le dosage peut se faire en retour : dosage retenu pour ce TP. La prise d'essai de matière grasse est dissoute, dans un excès de potasse alcoolique.

L'excès est dosé par une solution titrée d'acide chlorhydrique.

En application à l'étude du triglycéride homogène, RCOOH résultat d'une hydrolyse éventuelle du triglycéride.

Mode opératoire :

Pour ce dosage, le triglycéride est une solution isobutanol-éthanolique, de concentration égale à 40g/l.

Deux échantillons : 1^{er} échantillon l'huile d'olive.

2^{ème} échantillon l'huile végétale du commerce

Essais :

Dans une fiole d'ermeneyer, verser :

- 10 ml de potasse alcoolique __ 0,2N (poire d'aspiration).
- 10 ml du 1^{er} échantillon.
- 2 gouttes de phénol phtaléine.

Titre par une solution d'acide chlorhydrique agitant constamment jusqu'à décoloration stable (30 seconde).

-procéder de la même manière avec le 2^{eme} échantillon.

Témoin :

Opérer sur :

- 10 ml de potasse alcoolique __ 0,2 N (poire d'aspiration).
- 10 ml de solvant (isobutanol – éthanol).
- 2 gouttes de phénolphtaléine.

TP n°4 : Caractère amphotère des acides-aminés.

Fiche technique du TP :

But du TP :

- vérifier le caractère amphotère des acides-aminés.
- Vérifier l'amphotérie par la méthode de titrage.

Principe du TP :

- titration de la glycine par NaOH.
- Mesurer 50 ml de solution de glycine, verser dans un bécher, puis ajouter 3 à 4 goutte d'Hcl concentré et 1 ml de formol N, procéder comme en (1).
- Tracer la courbe sur le même graphe que pour la 2 ème titration, et la conclusion.

Matériels utilisés :

1) matériels :

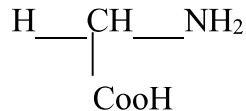
- burette graduée.
- Entonnoir
- Becher.
- Eprouvette de 50 ml.
- PH mètre.
- Papier millimétré, papier blanc.

2) Réactifs :

- NaOH N/2, acide acétique N/10, solution aqueuse glycine N/20, solution aqueuse d'asp N/20, Hcl concentré, formol N .

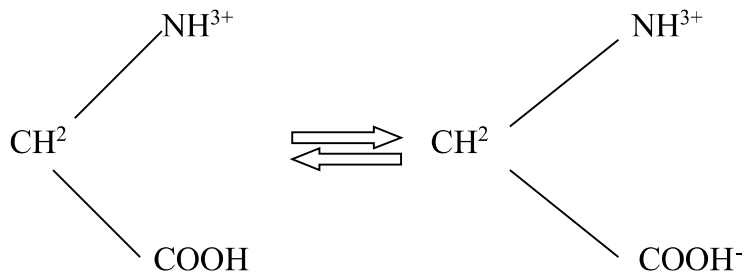
1) ionisation :

- c'est une propriété physicochimique essentielles car elle conditionne le comportement des aminoacides, et par généralisation celui des protéines, en solution aqueuse le PH du milieu.
- On à réaliser au TP une titration d'une solution par NaOH.
- La glycine : c'est le plus simple des acides aminés pour lequel R = H



- en milieu fortement acide, l'acide aminé est presque totalement sous la forme de cation A^+ , si par addition d'une base on élève graduellement le PH, le cation va céder successivement deux protons pour passer sous forme d'ions mixte.

A^1 – première dissociation PH= 1 et PH= 6



Le PH correspondant exactement au milieu de la zone isoélectrique.

Le PH est symbolisé : PHi, PI.

$$\text{PH} = \frac{\text{PK}_1 + \text{PK}_2}{2}$$

Calculer la valeur de Phi :

$$\text{Phi} = \frac{\text{PK}_1 + \text{PK}_2}{2}$$

$$\text{Phi} = \frac{3 + 10,73}{2} = 6,85$$

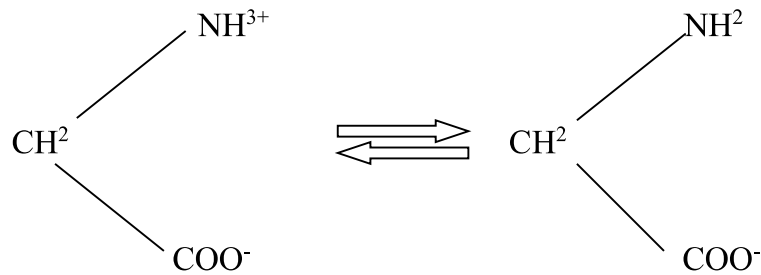
Comparaison de la valeur expérimentale et la valeur calculée on déduit du graphe la valeur de Phi

Phi = 6,52

La valeur calculée : Phi = 6,85

Ils sont presque égaux.

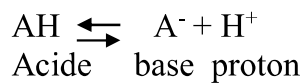
- deuxième dissociation, entre PH=6 et PH=12



- l'acide aminé est sous forme d'anion A^- pour les PH élevés (11-12),
l'élévation de PH correspond à l'ajout de grand quantité de volume de NaOH \implies
milieu alcalin \implies la fonction carbonyle se comporte comme une base.

Définition de la théorie de Bronsted :

Seront appelés acides tous les composés capable de céder un proton et baser
tous les composés capable de capter un proton.



TP n° 5 : Réaction d'identification de quelques aminoacides.

Fiche technique du TP :

But du TP :

- propriétés des A A et réaction biuret.
- mise en évidence de quelques AA.

Principe du TP :

1) réaction de la ninhydrine :

Réaction coloré nitrique fondamentale pour la mise en évidence et la détermination des aminoacides ($\lambda = 570$ nm), en excès à chaud produit une désamination, et proportionnelle à la quantité d'AA présente dans le milieu réactionnel.

Matériels et réactifs nécessaire :

Solution de glycine 10 g/l, solution d'ose (glu, fruc) 10g/l, solution de la ninhydrine 2 g/l, bain marie bouillant, tube à essai, pipette graduée de 2 ml, pipette pasteur à pointe coupée.

2) recherche au tryptophane :

Le tryptophane est oxydé en milieu acide.

Matériels et réactifs nécessaire :

- solution de tryptophane 10 g/l, solution de formaldéhyde 5% dans H₂O D d'acide acétique ; H₂SO₄ concentré, tube à essai, pipette de 1 ml, pipette pasteur à pointe coupée.

3) réaction des AA osomatique :

L'acide nitrique HNO₃ réagit sur les cycles aromatiques formant des dérivés mitrés, cette réaction s'accompagne de la formation d'un précipité lorsque l'on opère sur une protéine contenant ce type d'acides aminés.

Matériels et réactifs nécessaire :

Solution d'ovalbumine à 5 g/l, solution d'acides aminés aromatique à 30 g/l (tyrosine, tryptophane, phénylalanine), solution d'un acide aminé aromatique (glycine = témoin), acide nitrique concentré (HNO₃), 5 tube à essai, bec beneri, pipettes de 1 ml.

4) Réaction de Biuret :

La mise en évidence des liaisons peptidiques, réaction qui caractérise la liaison peptidique, s'applique à l'analyse qualitative et quantitative des peptides à condition que ces derniers confortent ou aminoacides aussi moins, entraînant la formation d'un complexe entre l'ion cuivrique et la liaison peptidique.

Matériels et réactifs nécessaire :

- solution de glycine « témoin » 10 g/l, solution d'ovalbumine 5 g/l,
- solution de sulfate de cuivre (CuSO₄) à 1%, lessive de soude, pipette graduée de 2 ml, pipette graduée de 1 ml, 2 tubes à essai.

1) Réaction de la ninhydrine :

Manipulation :

1 ml de glycine

+

5 gouttes de ninhydrine



1 ml de glucose

+

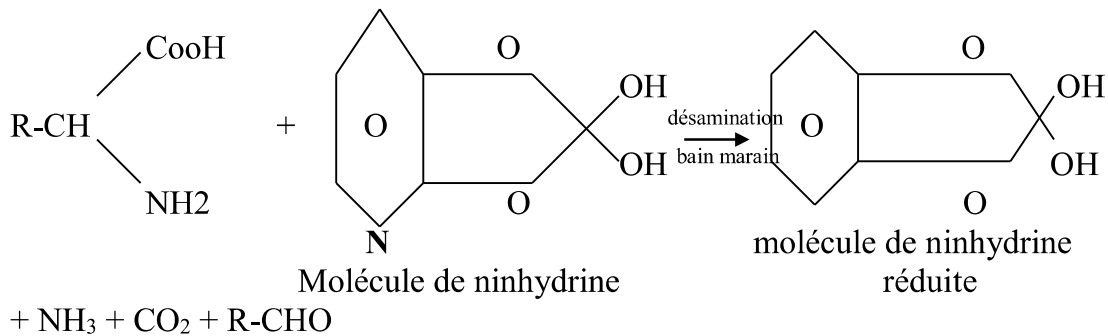
5 gouttes de ninhydrine



Agitation + bain marie 2 minutes

- le chauffage fournit une énergie et provoque une accélération de la réaction biochimique.
- Le ninhydrine joue ainsi le rôle d'une enzyme qui provoque la désamination au niveau des AA aliphatique d'après la réaction suivante

Réaction :



1 ere étape :

2 eme étape :

Observation : donne une coloration pourpre de Ruhemann

Conclusion :

la réaction à la ninhydrine est spécifique aux acides aminés.

3) recherche des AA aromatique :

a) recherche de la Trp (tryptophane) par l'acide sulfurique H_2SO_4 :

la tryptophane est oxydé en milieu acide, et pour cela on utilise le formole ou l'acide acétique.

Observation :

T₂ : précipité de la tryp == coloration brunâtre, et formation d'un anneau jaune marron flottant.

T₁ : pas de réaction == coloration transparente.

Conclusion :

la tryptophane est une acide aminée aromatique (cycle benzène) c'est ce qui lui permet de réagir avec le formol (réaction spécifique).

Réaction :

b) la liaison peptidique réaction de Biuret :

Réaction :

Rq : radicaux libres porteurs de cycle.

Observation :

T₁ : coloration violet.

T₂ : incolore.

Conclusion :

T₁ : contient l'ovalbumine (protéine), donc la présence de plusieurs AA liés entre eux avec des liaisons peptidique.

Donc : la réaction de biuret identifie la présence des liaisons peptidique.

c) Recherche des AA aromatiques par l'acide nitrique HNO₃ :

Observation :

T₁ : glycine == incolore par d'AA

T₂ : tyr == contient des AA aromatiques == coloration jaunâtre.

T₃ : try == coloration orange == présence d'AA aromatique.

T₄ : prot-oval == coloration jaune == présence d'AA aromatique.

Conclusion :

L'ovalbumine (protéine) contient un AA aromatique qui est tyrosine (même coloration dans le T₂ et T₄).

Conclusion générale :

- la réaction à la ninhydrine est spécifique au AA.
- La réaction à l'acide sulfurique est spécifique aux acides aminés aromatiques.
- La réaction de Biuret identifie la présence des liaisons peptidiques.
- L'ovalbumine qui est une protéine contient des AA aromatiques.