

## TP n° 02 : Dosage des protéines dans un blanc d'œuf par la méthode colorimétrique du BIURET

### 1. Introduction :

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour doser les protéines. La méthode effectuée dans le présent TP dite du biuret ; elle tire son nom de la molécule le biuret  $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$  (obtenu par condensation de 2 molécules d'urée  $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$  avec départ d'ammoniac) qui donne une coloration violette en réagissant avec le sulfate de cuivre  $\text{CuSO}_4$  dont le maximum d'absorption est à 540 nm. Par suite de leur analogie de structure avec le Biuret, Les peptides et les protéines donnent la même réaction. Cette technique a été développée par Gornall et al (1949).

### 2. Objectif du TP :

Le but de cette manipulation est la détermination de la concentration en protéines dans un liquide biologique (blanc d'œuf).

### 3. Principe :

En milieu alcalin les composés contenant au moins 2 groupements  $\text{-CO-NH-}$  voisins forment avec les ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) un complexe bleu-violet. Cette coloration se développe en particulier avec le BIURET ( $\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$ ) d'où son appellation de coloration du biuret. Les liaisons peptidiques étant de la forme  $\text{-CO-NH-}$ , cette coloration sera donc caractéristique des peptides et des protéines. La vitesse de développement de la coloration, sa couleur et son intensité dépendant de plusieurs facteurs :

- Alcalinité et concentration en ions  $\text{Cu}^{2+}$ .
- Température.
- Nature du peptide ou de la protéine (nombre de liaisons peptidiques).
- Concentration protéique

### 4. Matériel :

- 8 tubes à essais + 1 portoir.
- 2 petits béchers.
- 1 pipette graduée de 5 ml.
- Spectrophotomètre ( $\lambda = 540 \text{ nm}$ ).
- 1 pipette graduée de 1 ml.

### 5. Réactifs utilisés :

- **Réactif du Biuret :** Dissoudre 3 g de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$ ) et 9 g de tartrate double de Na/K dans 500 ml d'eau distillée. Ajouter 5g d'iodure de potassium et compléter avec une solution de soude 0,8 N. Le réactif du biuret doit être conservé dans un flacon bien fermé et à l'abri de la lumière.
- Solution mère de SAB et/ou de gélatine à 10g/l.
- Solutions des protéines du blanc d'œuf.

## 6. Mode opératoire :

### a) Préparation des solutions des protéines du blanc d'œuf :

- Peser un œuf à l'aide d'une balance de précision.
- Casser l'en deux et récupérer le blanc d'œuf.
- A l'aide d'une éprouvette, mesurer le volume du blanc d'œuf.
- Prélever 0,5 ml de blanc d'œuf et le diluer dans NaCl 1% qsp 20 ml : solution du blanc d'œuf (SB).
- Agiter la solution SB et la conserver pour le dosage des protéines.

### b) Préparation de la gamme d'étalonnage :

A partir de la solution mère de SAB et/ou de gélatine à 10g/l, réaliser une gamme allant de 0 à 10 g/l. Les dilutions sont effectuées avec du NaCl 1% comme indiqué dans le tableau.

- Incuber 30 minutes à l'obscurité.
- Lire l'absorbance au spectrophotomètre à 540 nm.

	Blanc	Gamme d'étalonnage					Blanc d'œuf	
TUBE N°	1	2	3	4	5	6	7	8
SAB ou GELATINE 10g/ L (ml)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	0	0
EAU PHYSIOLOGIQUE (ml)	1	0,8	0,6	0,4	0,2	0	0,5	0,5
ECHANTILLONS (ml)	0	0	0	0	0	0	0,5	0,5
REACTIF DE BIURET (ml)	4	4	4	4	4	4	4	4
PROTEINES / TUBE (mg/ml)	0	2	4	6	8	10		
A L'OBSCURITE	30 min							
ABSORBANCE (DO) à 540 nm								

## 7. Résultats :

- Etablir un tableau complet de colorimétrie : N° de tube, composition des tubes, Absorbance, quantités et concentration en protéine par tube.
- Tracer, sur papier millimétré, la courbe d'étalonnage :  $A = f(\text{quantité de protéines/tube})$ .
- En déduire la concentration en protéines (en g/L) dans les solutions de blanc d'œuf puis en déduire la teneur en protéines pour 100 g de blanc d'œuf.