

**SÉPARATION DES GLUCIDES RÉDUCTEURS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM).
DÉTERMINATION QUALITATIVE DES GLUCIDES PRESENTS DANS LE LAIT ECREME
ANALYSE DE L'ACTION DE LA BETA-GALACTOSIDASE**

Le premier objectif est d'identifier le ou les glucides présents dans le lait et d'analyser l'action d'une enzyme : la beta-galactosidase. Cette enzyme, plus communément appelée lactase, est capable d'hydrolyser le lactose (diholoside) en ses deux oses simples qui le composent. La manipulation sera menée sur le filtrat de lait préparé selon la méthode de Gabriel Bertrand (**voir TP Détermination de la teneur en lactose du lait**).

Le second objectif est de comparer un filtrat de lait préparé à partir de lait écrémé avec un filtrat de lait préparé à partir d'un lait écrémé délactosé (*Matin Léger*, Lactel).

1. PRINCIPE

1.1. Fractionnement chromatographique sur couche mince de silice

La chromatographie ascendante sur couche mince de silice permet une **séparation** rapide de mélange de sucres simples. Le principe de la technique est le même que celui de la chromatographie sur papier.

Les glucides à séparer se partagent entre une phase fixe, représentée par la couche de silice, et une phase mobile, constituée par le solvant qui migre. Leur migration est d'autant plus grande qu'ils ont moins d'affinité pour la phase fixe et qu'ils ont une plus grande affinité pour le solvant mobile.

La **séparation** de certains glucides ne demande qu'une chromatographie par double développement (meilleure séparation et moins de "traînées") dans le même sens et dans un seul solvant, alors que les autres ne sont séparés que par double développement bidimensionnel, et dans deux solvants différents.

1.2. Révélation et identification des glucides réducteurs

La **révélation** des glucides sur couche mince repose sur l'obtention des réactions colorées en utilisant les propriétés réductrices des fonctions aldéhydiques et cétoniques. En pratique, on provoque la réduction d'un composé organique, le triphényl tétrazolium chlorure (TTC), qui donne naissance au formazon rouge sombre.

L'identification est réalisée par comparaison avec la migration de oses étalons.

2. REACTIFS

- **Solutions à préparer**

Solutions pour migration et dépôts sur plaque :

1) **Phase mobile** : solvant : acétone-eau, 9 : 1 (v / v).



Sous la hotte (avec gants nitrile et lunettes), vous devez préparer 150 mL de solvant et l'introduire immédiatement dans la cuve de chromatographie que vous refermerez hermétiquement (les rebords de la cuve sont graissés pour éviter les fuites).

2) **Préparation d'un hydrolysât de lait par la beta-galactosidase :**

Introduire dans un flacon à vis, 2 mL de filtrat de lait (préparé selon la méthode de Gabriel Bertrand, voir énoncé TP détermination du lactose), ajouter 20 µL de solution de MgCl₂, 20 µL de solution de glutathion et 200 µL de beta-galactosidase. Agiter et laisser 1h30 sur la pailasse.

3) **A préparer avec des gants et des lunettes, sous la hotte :**



- Ethanol à 50 %, 1 volume d'eau : 1 volume d'éthanol (en quantité suffisante pour préparer les solutions de NaOH et TTC)
- NaOH 1 M dans éthanol à 50 %, soit 2 g NaOH dans 50 mL d'éthanol à 50 %
- TTC (réactif de révélation) : 1 g de triphényl tétrazolium chlorure, dissout dans 50 mL d'éthanol 50 %. Ce réactif doit être préparé fraîchement et conservé au froid et à l'abri de la lumière.

Transvaser le NaOH et le TTC chacun dans un vaporisateur.

! Le TTC est un composé organo-chloré qui doit impérativement être éliminé dans le bidon à solvants sous hotte



- **Solutions fournies**

- Solution de MgCl₂ à 10 mmol.L⁻¹
- Solution de glutathion à 10 mmol.L⁻¹
- Filtrat de lait préparé selon la méthode de G. Bertrand à partir d'un lait commercial délactosé (*Matin Léger* de Lactel)
- beta galactosidase préparée à 1,5 mg.mL⁻¹
- Solutions à 0,25 g / 100 mL de chacun des oses suivants : glucose, galactose et saccharose préparées dans une solution d'éthanol à 60 % (meilleure évaporation au moment du dépôt).
- Solution de lactose à 0,5 g / 100 mL préparée dans une solution d'éthanol à 60 %. Préparez également un mélange glucose/galactose (0,25 g de chaque sucre dans 100 mL).

3. Matériel

- Fioles jaugées de 20 mL, éprouvette de 250 mL.
- Plaque de silice prête à l'emploi.

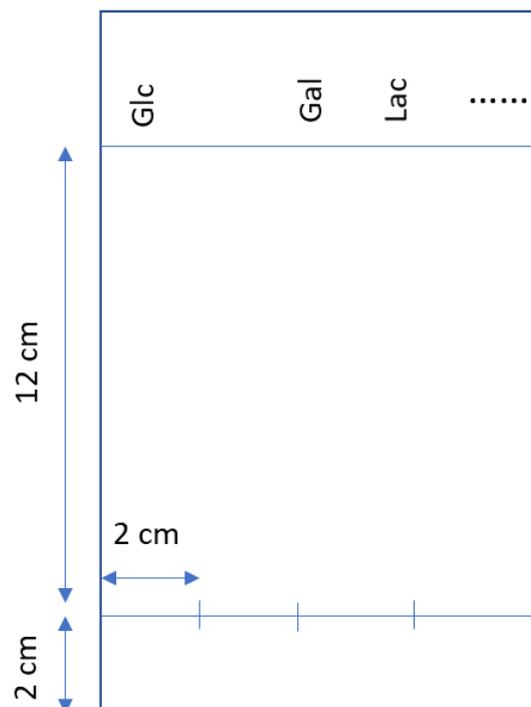
- Cuve à chromatographie.
- Capillaires de 20 μ L.
- Tube à essai à vis.
- Verrerie classique.
- Vaporisateurs pour les deux réactifs de révélation
- Séchoir, étuve à 110 ° C.

4. MANIPULATION

- **Préparation des chromatogrammes :**

Sur les deux bords latéraux de la plaque, à 2 cm du bord inférieur et à 12 cm (de ce trait), tracer finement au crayon graphite une ligne **en prenant bien soin de ne pas entamer la silice** (ce qui modifierait la migration).

Pour éviter toute confusion au cours de la révélation, le nom des sucres et le numéro des plaques doivent être marqués au crayon graphite **sur la partie supérieure du chromatogramme** (voir dessin ci-dessous).



- **Dépôt des échantillons**

Les dépôts de 20 μ L sont effectués à l'aide **de capillaires à usage unique**, au niveau du trait de crayon inférieur et tous les 2 cm.

Les dépôts doivent être faits le plus ponctuellement possible (dépôt d'une fine goutte, sécher au séchoir, puis redéposer exactement sur la première goutte une autre fine goutte jusqu'à ce que le prélèvement total soit déposé).

Réaliser des dépôts de **20 µL** de chacun des oses suivants : galactose, glucose, lactose, saccharose, **40 µL** du filtrat de lait écrémé préparé par vos soins, **20 µL** du filtrat de lait dé lactosé qui vous est fourni, **20 µL** de l'hydrolysate beta-galactosidase (2 dépôts non contigus), **20µL** du mélange glucose/galactose.

- **Développement**

Les chromatogrammes sont placés dans la cuve contenant le solvant (cuve saturée en solvant), celle-ci étant bien bouchée. Le solvant doit arriver à 1 cm du bord inférieur de la plaque.

Quand le solvant a atteint la ligne tracée à 12 cm (environ 40-45 min.), retirer la plaque et la laisser sécher sous la hotte, puis la remettre une 2^{ème} fois dans la cuve pour le double développement par le même solvant dans le même sens.

Quand le solvant atteint la ligne située à 12 cm de la ligne de dépôt, retirer la plaque et la laisser sécher de nouveau.

- **Révélation**



Vaporiser la solution de soude sur la plaque **sous la hotte avec gants et lunettes**. Sécher au séchoir.

Vaporiser ensuite la solution de TTC sur la plaque **sous la hotte avec gants et lunettes**. Sécher à 110 °C (étuve) jusqu'à l'apparition de taches rouges prononcées (minimum 20 min).

Mesurer la distance de déplacement de chacun des sucres en vue de leur identification pour les étalons, les deux filtrats et l'hydrolysate à caractériser.

5. CALCULS ET EXPRESSION DU RÉSULTAT

Il s'agit de comparer les rapports frontaux (Rf) calculés comme suit :

$$R_f = \frac{\text{Distance de déplacement de la substance (cm)}}{\text{Distance de déplacement du front de solvant (cm)}}$$

Après la chromatographie et la révélation, calculer les rapports frontaux de chaque composé séparé et en déduire la composition qualitative du filtrat de lait et celle du filtrat de lait dé lactosé (par comparaison avec les sucres étalons). Interpréter l'action de la beta-galactosidase.

5. CALCULS PREPARATOIRES A EFFECTUER AVANT LE JOUR DU TP

* Préparation de **150 mL** du solvant de migration acétone : eau (90 : 10) :

Volume d'acétone = mL et volume d'eau = mL