

Chapitre III : Protéines

III.1. Méthode de Kjeldahl

C'est une méthode de référence pour la détermination des protéines dans les aliments. Il existe deux versions de la méthode qui utilisent le même principe: la méthode macro-Kjeldahl et la méthode micro-Kjeldahl. Elles diffèrent seulement par l'appareillage utilisé et les quantités d'échantillon.

Principe :

- Minéralisation d'une quantité pesée de l'échantillon grâce à un appareil de minéralisation en bloc, à l'aide d'un mélange d'acide sulfurique concentré et de sulfate de potassium, en utilisant du sulfate de cuivre (II) comme catalyseur pour convertir l'azote des composés organiques présents en sulfate d'ammonium
- Adjonction d'hydroxyde de sodium en quantité excédentaire au digestat refroidi pour libérer l'ammoniac
- Distillation de l'ammoniac à l'aide d'un appareil automatique de distillation à la vapeur, le distillat est recueilli dans une solution d'acide borique
- titration à l'aide d'une solution d'acide sulfurique
- calcul de la teneur en azote de l'échantillon en fonction de la quantité d'ammoniac produite, proportionnelle au volume d'acide versé.

On fait un blanc en mettant tous les réactifs sauf l'échantillon, pour soustraire l'ammoniac contenu dans les réactifs de l'ammoniac contenu dans l'échantillon.

Calcul du % de protéines dans l'échantillon

Le % de protéines dans l'échantillon est obtenu en multipliant le % d'azote par un facteur F dépendant du type d'aliment analysé.

$$\% \text{ protéines} = \% \text{ N} \times F = (V_E - V_B) \times CN \times 14,01 \times F / M(\text{échantillon})$$

III.2. Méthode de Dumas

La méthode de Dumas est également basée sur le dosage de l'azote protéique par minéralisation poussée des protéines. Cette méthode est plus juste que la méthode de Kjeldahl puisqu'elle permet de doser toutes les formes de l'azote, mais elle est très délicate. Elle

fonctionne bien sur des poudres homogènes. Les échantillons doivent de plus être d'un volume très réduit et ne pas contenir trop d'eau. Le lait, du fait de la présence des divers constituants (protéines, matière grasse, ...) se prête moins bien à cette technique. Elle a été supplantée par la méthode de Kjeldahl comme méthode de référence. Dans cette méthode, les substances organiques sont brûlées sous atmosphère d'oxygène dans un circuit fermé. L'excédent d'oxygène est fixé à haute température par de la poudre de cuivre. Les produits de la combustion (vapeur d'eau et gaz carbonique) sont absorbés par une solution concentrée de potasse. Les oxydes d'azote sont réduits, à chaud, par du cuivre en azote moléculaire (N₂). La teneur en azote moléculaire est mesurée volumétriquement au moyen d'une burette à gaz, ou par chromatographie en phase gazeuse.

III.3. Méthode de Kofranyi

La méthode de Kofranyi repose sur la propriété qu'ont les protéines de libérer une certaine quantité d'ammoniac, dans un milieu fortement alcalin (NaOH). L'ammoniac est distillé (10 min), fixé par une solution d'acide borique et titré par HCL. Le mécanisme de la réaction est mal connu. La validité de la méthode est limitée car toutes les protéines ne possèdent pas le même nombre d'acides aminés susceptibles de libérer de l'ammoniac. Cette méthode a été appliquée au lait. Elle a été utilisée comme méthode de dosage de routine. Elle a l'inconvénient d'être coûteuse et n'est, semble-t-il, plus utilisée.

III.4. Méthodes colorimétriques

Des méthodes colorimétriques sont souvent utilisées pour déterminer la concentration totale des protéines. Ces méthodes sont basées sur la réaction d'agents chromophores avec les liaisons peptidiques ou avec certains acides aminés des protéines. Cette réaction donne naissance à une coloration (dans le visible) dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration de la protéine. Les méthodes les plus utilisées sont celles de Biuret, Lowry et Bradford.

III.4.1. Méthodes du Biuret

La méthode consiste à mettre en milieu basique des ions cuivre(II) en présence de protéines (ou de biuret). C'est une méthode colorimétrique de protéines. En milieu alcalin, les protéines liées au réactif de Gornall forment un complexe coloré en bleu-violet en présence des sels de cuivre, dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en protéines. Cette coloration varie également en fonction de la nature des protéines à doser, de l'alcalinité

du milieu, de la concentration en sulfate de cuivre et de la température. Un dosage colorimétrique est réalisé à 540 nm.

III. 4.2. Méthode de Lowry

C'est une méthode de dosage colorimétrique de protéines. Elle est essentiellement basée sur la méthode du biuret, l'absorbance est mesurée à 745nm, l'un des inconvénients de cette méthode est qu'il peut y avoir interférence de plusieurs substances tel que le saccharose l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA)

III.4.3. Méthode de Bradford

C'est une méthode spectrophotométrique, elle est utilisée pour déterminer les concentrations de protéines en solution, il s'agit d'un dosage colorimétrique au Bleu de Coomassie G250, basé sur le changement d'absorbance se manifestant par le changement de la couleur du bleu de Coomassie après sa liaison avec les acides aminés basiques (Histidine, Arginine, Lysine) et les résidus hydrophobes de la protéine

III.5. Méthode immuno-enzymatique

Il existe des méthodes beaucoup plus précises, c'est notamment le cas de la méthode d'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), qui est une méthode immunoenzymatique dans laquelle le dosage des concentrations de protéines dans une solution est couplé à une réaction catalysée par une enzyme, qui libère un composant coloré suivi par une spectroscopie, mais l'inconvénient de cette technique, c'est que : une seule protéine est dosée à la fois.

III.6. Méthodes électrophorétiques

L'électrophorèse permet la séparation de molécules chargées : protéines, peptides, acides aminés. Elle permet dans certaines conditions (emploi de micelles de détergents ioniques) de séparer des molécules non ioniques.

La révélation des fractions peut être globale (rouge Ponceau, Amido-schwartz, vert de lissamine, bleu de Coomassie) ou spécifique (révélation des lipoprotéines avec un colorant des lipides, révélation d'une activité enzymatique...).

La lecture peut se faire à l'œil nu (analyse qualitative) ou par densitométrie (enregistrement de l'absorbance en fonction de la distance de migration) ; dans ce cas,

l'intégration des pics permet une analyse quantitative des fractions; ou encore le dosage peut être effectué après élution des fractions.

III.7. Méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques permettent la séparation et la quantification des différentes protéines d'un mélange. La chromatographie sur DEAE cellulose, sur hydroxyapatite et par filtration sur gel sont des méthodes longues, pouvant difficilement être utilisées pour des dosages de routine. Le développement des techniques chromatographiques rapides comme la FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) et la HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) suscitent dans ce domaine de nombreux espoirs (abaissement des temps d'analyse, sensibilité accrue).